

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



03 DEC 2004



(43) 国際公開日
2003 年 12 月 11 日 (11.12.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/102180 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, (72) 発明者; および
C07K 14/47, A61K 38/00, A61P 3/04, 7/10, 9/10, 9/12, (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 南野 直人 (MI-
19/10, 25/04, 35/00, 43/00 NAMINO, Naoto) [JP/JP]; 〒572-0806 大阪府 寝屋川市
大字高宮 6 5 2-3 3 5 Osaka (JP). 片渕 剛 (KATA-
FUCHI, Takeshi) [JP/JP]; 〒567-0057 大阪府 茨木市 豊
川 4-2 6-8-3 0 4 Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/06641
- (22) 国際出願日: 2003 年 5 月 28 日 (28.05.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-162797 2002 年 6 月 4 日 (04.06.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学
技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOL-
OGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川
口市 本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP). 国立循環器病
センター総長が代表する日本国 (JAPAN AS REPRESENTED BY PRESIDENT OF THE NATIONAL CAR-
DIOVASCULAR CENTER) [JP/JP]; 〒565-8565 大阪府
吹田市 藤白台 5-7-1 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 佐伯 憲生 (SAEKI, Norio); 〒103-0027 東京都
中央区 日本橋三丁目 1 5 番 2 号 高愛ビル 9 階 Tokyo
(JP).
- (81) 指定国 (国内): CN, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL PEPTIDES HAVING cAMP PRODUCING ACTIVITY

(54) 発明の名称: cAMP の産生活性を有する新規ペプチド

(57) Abstract: It is intended to provide novel and useful proteins which are expressed in the central nerve system and act on a calcitonin receptor, genes thereof and medicinal compositions containing the same. Peptides having at least the following amino acid sequence: Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His- 10 Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly- 20 Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr- 30 Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Phe-Gly 38; or an amino acid sequence derived from the amino acid sequence by deletion, substitution or addition of part of these amino acids and having the following characteristics (1) being expressed in the central nerve system, (2) strongly acting on a calcitonin receptor, and (3) promoting the cAMP-productivity of a cell, and, still preferably, (4) concentration-dependently incorporating sodium ion, (5) inhibiting the uptake of calcium ion, and (6) inhibiting cell proliferation; genes encoding these peptides; and medicinal compositions containing the same.

[続葉有]

BEST AVAILABLE COPY

WO 03/102180 A1



(57) 要約:

本発明は、中枢神経系に発現し、カルシトニン受容体に作用する新規かつ有用な蛋白質、その遺伝子、及びそれを含有してなる医薬組成物を提供する。

本発明は、少なくとも次ぎのアミノ酸配列、

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-	10
Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-	20
Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-	30
Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Phe-Gly	38

又はこれらのアミノ酸配列の一部のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加したアミノ酸配列を有し、(1) 中枢神経系において発現し、(2) カルシトニン受容体に強く作用する性質、(3) 細胞の cAMP 産生能を促進させる性質を有するペプチド、より好ましくはさらに(4) ナトリウムイオンを濃度依存的に取り込む性質、(5) カルシウムイオンの取り込みを抑制する性質、及び(6) 細胞増殖を抑制する性質を有するペプチド、これらのペプチドをコードする遺伝子、及びそれを含有してなる医薬組成物に関する。

明 細 書

c A M P の産生活性を有する新規ペプチド

技術分野

本発明は、新規かつ有用なペプチド、それをコードする遺伝子、及びそれを含有してなる医薬組成物に関する。より詳細には、本発明は、次の（１）～（１０）の性質、（１）中枢神経系において発現し、（２）カルシトニン受容体に強く作用し、（３）細胞の c A M P 産生能を促進させ、（４）ナトリウムイオンを濃度依存的に取り込む作用を有し、（５）カルシウムイオンの取り込みを抑制し、（６）細胞増殖を抑制する作用を有するペプチド、それをコードする遺伝子、及びそれを含有してなる医薬組成物に関する。

背景技術

既知ペプチドであるカルシトニンは、３２個のアミノ酸からなるポリペプチドホルモンである。哺乳動物では甲状腺のＣ細胞から分泌され、血液カルシウムを低下させる作用を有する。高カルシウム血症や代謝性骨疾患などの治療薬として利用されている。カルシトニンは、甲状腺など末梢系に存在するとされていて中枢神経系には発現していないとされていた。しかし、カルシトニン受容体は中枢神経系にも存在し、中枢神経系におけるカルシトニン受容体の存在意義や作用についての解明が求められていた。

また、カルシトニン遺伝子関連ペプチド（C G R P）はアミノ酸３７個からなる蛋白質であり、カルシトニンと同じ遺伝子から転写された m R N A が、カルシトニンとは異なるスプライシングを受けて生成されるものである。カルシトニン遺伝子関連ペプチド（C G R P）は、カルシトニンと同様な血液カルシウム濃度を低下させる作用も有するが、カリウムイオンチャンネルの活性化作用やアセチルコリン受容体の数を増加させる作用などもあり、神経伝達物質である可能性もあるとされている。C G R P は主に感覚求心性神経および中枢神経に局在化しており（Goodman, et al., Life Sci. 38:2169-2178(1986); Poyner, D. R. Pharmac. Ther.

56:23-51(1992))、主としてアデニルシクラーゼの活性化に関連していることも報告されている。これらのCGRPは、末梢および脳の血管拡張作用 (Brain, et al., Nature 313:54-56(1985))、心拍数増加作用 (Sigrist, et al., Endocrinology 119:381-389(1986))、カルシウム代謝調節作用 (Grunditz, et al., Endocrinology 119:2313-2324(1986))、腸運動低下作用 (Fargeas, et al., Peptides 6:1167-1171(1985))、グルコース代謝調節作用 (インスリン分泌およびインスリン感受性の低下) (Hermansen, et al., Reg. Peptides 27:149-157(1990))、食欲抑制作用 (Molina, et al., Diabetes 39:260-265(1990)) および成長ホルモン放出抑制作用 (Tannenbaum, et al., Endocrinology 116:2685-2687(1985)) などの種々の作用を有することが報告されている。

また、CGRP受容体が、脳、心臓血管系、内皮および平滑筋などの細胞に存在することも既に知られている。

そして、約10,000ダルトン未満の分子量を有し、放射性金属キレート化剤に共有結合して試薬を形成し、該試薬が、カルシトニン受容体に対する放射性ヨウ素化された天然のカルシトニンの結合親和性以上の該受容体に対する結合親和性を有することを特徴とする合成の、カルシトニン受容体結合化合物に関する発明 (特表2001-523257号)、ピリドン誘導体からなるカルシトニン受容体作動物質に関する発明 (特開2001-294574号)、ヒト・カルシトニン遺伝子関連ペプチド受容体成分因子 (CGRP-RCF) のポリヌクレオチドおよびポリペプチドに関する発明 (特開平10-201482号) なども報告されている。

発明の開示

しかし、これらの蛋白質は中枢神経系のカルシトニン受容体に直接作用するものであると確認されておらず、中枢神経系のカルシトニン受容体に直接かつより強力に作用するペプチドが求められていた。

本発明は、中枢神経系に発現し、カルシトニン受容体に作用する新規かつ有用なペプチド、その遺伝子、及びそれを含有してなる医薬組成物を提供することを目的としている。

本発明者らは、中枢神経系から c A M P 産生を指標にして新規な生理活性ペプチドを探索してきた結果、カルシトニン受容体を介して細胞に作用すると考えられる新規なペプチドを単離、精製した。この構造は、データベース (Genbank, swissprot, DDBJ) の検索結果から新規配列であることが確認された。本発明者らはこの新規なペプチドがカルシトニン受容体に作用することからカルシトニン受容体刺激ペプチド (Calcitonin Receptor-Stimulating Peptide (C R S P)) と命名した。

即ち、本発明は、少なくとも次ぎのアミノ酸配列、

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-	10
Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-	20
Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-	30
Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Phe-Gly	38

又はこれらのアミノ酸配列の一部のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加したアミノ酸配列を有し、(1) 中枢神経系において発現し、(2) カルシトニン受容体に強く作用する性質、(3) 細胞の c A M P 産生能を促進させる性質を有するペプチド、より好ましくはさらに(4) ナトリウムイオンを濃度依存的に取り込む性質、(5) カルシウムイオンの取り込みを抑制する性質、及び(6) 細胞増殖を抑制する性質を有するペプチドに関する。

より具体的には、本発明は、配列表の配列番号 1、配列番号 2、配列番号 6、配列番号 9、配列番号 12、配列番号 16、若しくは配列番号 19 で示されるアミノ酸配列、又はこれらのアミノ酸配列の一部のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加したアミノ酸配列であって 75% 以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する前記のペプチドに関する。

また、本発明のペプチドはカルシトニン遺伝子関連ペプチド (C G R P) と相同性を有するペプチドを含むものであるから、C R S P の有する効果に加えて C G R P に類似した生理活性も期待できる場合がある。即ち、本発明のペプチドは、前記の (1) ~ (6) の性質に加えて、(7) カルシトニン関連ペプチド受容体に強く作用し、(8) 血管の弛緩作用を有し、(9) 利尿を促進させ、(10) 血管内皮細胞や血管平滑筋、線維芽細胞の増殖能を変化させる作用などの C G R

Pが有する作用と類似した作用を有することも期待される場合もある。

また、本発明は前記した本発明のペプチドをコードする塩基配列を有する遺伝子に関する。より詳細には、本発明は、遺伝子が、配列表の配列番号3、配列番号7、配列番号10、配列番号13、配列番号17、若しくは配列番号20で示される塩基配列を有する前記した遺伝子に関する。

さらに、本発明は、前記した本発明のペプチド少なくとも1種、及び製薬上許容される担体からなる医薬組成物に関する。より詳細には、本発明は、医薬組成物が、骨粗鬆症の予防・治療剤、癌の予防・治療剤、利尿剤、食欲抑制剤、鎮痛剤、降圧剤、又はPTCA（経皮的冠動脈形成術）後の再狭窄を防ぐための薬剤である前記した医薬組成物に関する。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明のペプチドのCRSPの構造を模式的に示すものである。

第2図は、本発明のペプチドのCRSP（pCRSP）のアミノ酸配列と、ブタカルシトニン遺伝子関連ペプチド（pCGRP-I）、ヒトカルシトニン遺伝子関連ペプチドI（hCGRP-I）、ヒトカルシトニン遺伝子関連ペプチドII（hCGRP-II）、ヒトアミリン（hAmylin）、ブタカルシトニン（pCT）、及びヒトアドレノメデュリン（hAM）のアミノ酸配列との比較を示すものである。

第3図は、本発明のペプチドのCRSPの発現部位を調べるためにノーザンブロッティングを行った結果を示す図面に代わる写真である。第3図中の矢印は、CRSPの位置を示している。

第4図は、LLC-PK₁細胞を用いた本発明のペプチドのCRSPのcAMP産生活性を検討した結果を示すものである。第4図の縦軸はcAMPの産生量（pmol/10⁵細胞/30分）を示し、横軸は各ペプチドの濃度の逆対数（-log（ペプチド濃度（M）））を示す。第4図の黒丸（●）は本発明のCRSPを示し、白丸（○）はブタカルシトニン遺伝子関連ペプチド（pigCGRP）を示し、白菱形（◇）はブタカルシトニン（pigCT）をそれぞれ示す。

第5図は、LLC-PK₁細胞を用いた本発明のペプチドのCRSPによるE I

P A 非存在下でのナトリウムイオンの取り込み試験の結果を示すものである。

第5図の縦軸は各イオンの取り込み量 (c p m) を示し、横軸に左端はコントロール (ペプチド無添加) を示し、その右は各濃度の C R S P を示す。***は $p < 0.001$ で有意差があったことを示す。

第6図は、L L C - P K₁細胞を用いた本発明のペプチドの C R S P による E I P A 存在下でのナトリウムイオンの取り込み試験の結果を示すものである。第6図の縦軸は各イオンの取り込み量 (c p m) を示し、横軸に左端はコントロール (ペプチド無添加) を示し、その右は各濃度の C R S P と E I P A を示す。***は $p < 0.001$ で有意差があったことを示す。

第7図は、L L C - P K₁細胞を用いた本発明のペプチドの C R S P によるカルシウムイオンの取り込み試験の結果を示すものである。第7図の縦軸は各イオンの取り込み量 (c p m) を示し、横軸に左端はコントロール (ペプチド無添加) を示し、その右は s C T (サケカルシトニン) 及び C R S P を示す。*は $p < 0.05$ で、**は $p < 0.01$ で有意差があったことを示す。

第8図は、L L C - P K₁細胞における本発明のペプチドの C R S P による細胞増殖に伴って合成された DNA 量の測定結果を示す。第8図の縦軸は $^{125}\text{I} - \text{D U}$ の取り込み量 ($\times 100 \text{ c p m} / \text{ウエル}$) を示し、横軸は各ペプチドの濃度の逆対数 ($-\log (\text{ペプチド濃度 (M)})$) を示す。第8図の黒丸 (●) は本発明の C R S P を示し、白丸 (○) はブタカルシトニン (ブタ C T) を示し、白菱形 (◇) はサケカルシトニン (サケ C T) をそれぞれ示す。

第9図は、L L C - P K₁細胞における本発明のペプチドの C R S P による細胞増殖に伴う細胞数を計数板にて計測結果を示す。第9図の縦軸は細胞数 ($\times 1,000$ 細胞 / ウエル) を示し、横軸は左端はコントロール (C R S P 無添加) を示し、その右は各濃度の C R S P を示す。*印は $p < 0.05$ で有意差があったことを示す。

第10図は、遺伝子工学的にカルシトニン受容体を発現している細胞 (C O S - 7) における本発明のペプチドの C R S P 刺激による c A M P 産生能測定結果を示す。第10図の縦軸は c A M P の産生量 ($\text{p m o l} / \text{ウエル} / 30 \text{ 分}$) を示し、横軸は各ペプチド (リガンド) の濃度の逆対数 ($-\log (\text{リガンド濃度})$) を示す。

(M))を示す。第10図の黒丸(●)は本発明のCRSPを示し、白菱形(◇)はブタカルシトニン(pCT)をそれぞれ示す。

第11図は、ブタカルシトニン受容体(CTR)を発現させたオボッサム腎上皮細胞における本発明のペプチドのCRSP刺激によるcAMP産生能測定結果を示す。第11図の縦軸はcAMPの産生量(fmol/ウエル/1時間)を示し、横軸はCRSPの濃度の逆対数(-log(CRSP濃度(M)))を示す。第11図の黒丸(●)はブタカルシトニン受容体(CTR)を導入したオボッサム腎上皮細胞の場合を示し、黒四角(■)はオボッサム腎上皮細胞(OK細胞)の場合を示す。

第12図は、ブタカルシトニン受容体(CTR)を発現させたオボッサム腎上皮細胞における本発明のペプチドのCRSP刺激によるナトリウムイオンの取り込み試験の結果を示す。第12図の縦軸はナトリウムイオンの取り込み量の比(コントロールを100とする)を示し、横軸はCRSPの濃度の逆対数(-log(CRSP濃度(M)))を示す。第12図の黒丸(●)はブタカルシトニン受容体(CTR)を導入したオボッサム腎上皮細胞の場合を示し、黒四角(■)はオボッサム腎上皮細胞(OK細胞)の場合を示す。第12図中の***印は $p < 0.001$ で有意差があったことを示す。

第13図は、ラットにおける本発明のペプチドのCRSP投与による血中カルシウム濃度の変化を測定した結果を示す。第13図の縦軸は血中カルシウム濃度(mM)を示し、横軸は時間(分)を示す。第13図中の**印は $p < 0.01$ で有意差があったことを示す。

第14図は、ラットにおける本発明のペプチドのCRSP投与による血圧の変化を測定した結果を示す。第14図の縦軸は血圧(mmHg)を示し、横軸は時間(分)を示す。

第15図は、ブタカルシトニン受容体(CTR)を哺乳類発現ベクターpcDNA3.1に導入し、アカゲザル腎細胞(COS-7)に発現させた細胞に対し、CRSP又はCRSP-Gly刺激によるcAMP産生量をラジオイムノアッセイにより測定した結果を示す。縦軸はcAMPの産生量(pmol/ウエル/130分)を示し、横軸はCRSPの濃度の逆対数(-log(CRSP濃度

(M))) を示す。

第16図は、LLC-PK₁細胞を用いた本発明のペプチドのブタCRSP、ウシCRSP及びイヌCRSPのcAMP産生促進活性を検討した結果を示すものである。縦軸はcAMPの産生量 (pmol/ウエル/10分) を示し、横軸はCRSPの濃度の逆対数 ($-\log(\text{CRSP濃度(M)})$) を示す。第16図の(■)はブタCRSPを示し、(●)はウシCRSPを示し、(▲)はイヌCRSPをそれぞれ示す。

第17図は、CRSP遺伝子の塩基配列を示す。下線部がエクソンを示す。下線部の下にCRSP遺伝子のコードするアミノ酸配列を示す。

第18図は、CRSP-2遺伝子の塩基配列の前半部分(1~3840塩基)を示す。

第19図は、CRSP-2遺伝子の塩基配列の後半部分(3841~7673塩基)を示す。下線部がエクソンを示す。下線部の下にCRSP-2遺伝子のコードするアミノ酸配列を示す。

第20図は、CRSP-2のcDNA塩基配列を示す。第20図において、実線で囲まれた部分が成熟ペプチドで、灰色がアミドに変換されると推定されるグリシンを示す。

第21図は、CRSP-3のcDNA塩基配列を示す。第21図において、実線で囲まれた部分が成熟ペプチドで、灰色がアミドに変換されると推定されるグリシンを示す。

第22図は、CT-2のcDNA塩基配列を示す。第22図において、実線で囲まれた部分が成熟ペプチドで、灰色がアミドに変換されると推定されるグリシンを示す。第22図における成熟体のN末端側にあるグルタミンはピログルタミン酸に変換されると推定される。

第23図は、各CRSPとCGRPやAM、CT-2とCTのアミノ酸の比較を行った図を示す。

本発明のペプチドのCRSP (pCRSP)、CRSP-2 (pCRSP-2)、CRSP-3 (pCRSP-3)、CT-2 (pCT-2) のアミノ酸配列と、ブタカルシトニン遺伝子関連ペプチド (pCGRP)、ブタカルシトニン

(pCT)、及びブタアドレノメデュリン (pAM) のアミノ酸配列との比較を示すものである。

第24図は、CRSP、CRSP-2、CRSP-3、CT-2、CT、CGRPの遺伝子発現量をRT-PCRにより高感度定量した結果を示す。図の縦軸に各種遺伝子を、横軸に遺伝子発現量を測定したブタの組織を示す。トータルRNA量の補正のためにGAPDH (グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素) の発現量についても測定した。

発明を実施するための最良の形態

本発明者らは、ブタ脳抽出液から腎臓上皮細胞のcAMP産生を指標にして2種の新規な生理活性ペプチドを精製した。得られたペプチドのアミノ酸配列を解析したところ、

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-	10
Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-	20
Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-	30
Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Phe-Gly-NH ₂	38

という38個のアミノ酸からなるペプチド (以下、このペプチドをCRSPという。) と、そのC末端にさらにグリシンが結合した、

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-	10
Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-	20
Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-	30
Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Phe-Gly-Gly-OH	39

という39個のアミノ酸からなるペプチド (以下、このペプチドをCRSP-Glyという。) であることがわかった。

そして、これらのペプチドのアミノ酸配列をデータベース (Genbank, swissprot, DDBJ) で検索したところ、いずれも新規なアミノ酸配列を有するものであることが確認された。

これらのアミノ酸配列を配列表の配列番号1及び2にそれぞれ示す。

得られたペプチドのアミノ酸配列に基づいて合成プライマーを作成し、ブタ遺

伝子を鋳型にPCR法で増幅することにより、目的の遺伝子をクローニングした。

用いたプライマーは、アミノ酸配列を基にN末端側として、

TG(C/T)AA(C/T)AC(A/C/G/T)GC(A/C/G/T)AC(A/C/G/T)TG(C/T)ATGAC、及び、
C末端側として、

CC(A/G)AA(A/C/G/T)AC(C/T)TT(A/G)AA(A/C/G/T)CCCATA

であった。

得られた遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号3に示し、それがコードしているアミノ酸配列を以下に示す。

Met-Gly-Phe-Trp-Lys-Phe-Pro-Pro-Phe-Leu-	10
Val-Leu-Ser-Ile-Leu-Val-Leu-Tyr-Gln-Ala-	20
Gly-Met-Phe-His-Thr-Ala-Pro-Met-Arg-Ser-	30
Ala-Phe-Gly-Ser-Pro-Phe-Asp-Pro-Ala-Thr-	40
Leu-Ser-Glu-Glu-Glu-Ser-Arg-Leu-Leu-Leu-	50
Ala-Ala-Met-Val-Asn-Asp-Tyr-Glu-Gln-Met-	60
Lys-Ala-Arg-Glu-Met-Gln-Lys-Gln-Arg-Ala-	70
Gln-Gly-Ser-Gly-Ile-Ser-Val-Gln-Lys-Arg-	80
<u>Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-</u>	90
<u>Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-</u>	100
<u>Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-</u>	110
<u>Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Phe-Gly-Gly-Arg-</u>	120
Arg-Arg-Asn-Phe-Trp-Ile	126

(式中、下線を引いた81番目～118番目までがCRSPである。)

このアミノ酸配列を配列表の配列番号4に示す。

ブタCRSPをプローブにしてウシ及びイヌ甲状腺cDNAライブラリーから本発明のペプチドを得た。

ウシのアミノ酸配列は、アミノ酸の1文字コードで示すと、

ACNTATCMTHRLAGWLSRSG

SMVRSNLLPTKMGFKIFNGP-OH

である。これをアミノ酸の3文字コードで示すと次のようになる。

Ala-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-	10
Arg-Leu-Ala-Gly-Trp-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-	20
Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-	30
Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Ile-Phe-Asn-Gly-Pro-OH	40

また、イヌのアミノ酸配列は、アミノ酸の1文字コードで示すと、

SCNSATCVAHWLGGLLSRAG
SVANTNLLPTSMGFKVYN-OH

である。これをアミノ酸の3文字コードで示すと次のようになる。

Ser-Cys-Asn-Ser-Ala-Thr-Cys-Val-Ala-His-	10
Trp-Leu-Gly-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ala-Gly-	20
Ser-Val-Ala-Asn-Thr-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-	30
Ser-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Tyr-Asn-OH	38

これらのアミノ酸配列、塩基配列、及び遺伝子がコードしている全アミノ酸配列をそれぞれ配列表に示す。

ウシの本発明のペプチドのアミノ酸配列を配列表の配列番号6に示し、その遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号7に示し、その遺伝子に基づくペプチドのアミノ酸配列を配列番号8にそれぞれ示す。

また、イヌの本発明のペプチドのアミノ酸配列を配列表の配列番号9に示し、その遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号10に示し、その遺伝子に基づくペプチドのアミノ酸配列を配列番号11にそれぞれ示す。

ブタCRSPのコード領域全長をプローブとして、ブタ遺伝子ライブラリーよりCRSPと相同性を有するペプチドをコードする遺伝子を得た。この遺伝子の産物であるペプチドをそれぞれ、CRSP-2、CRSP-3と名付けた。

また、同様にして、ブタカルシトニン(CT)と相同性を持つペプチドをコードする遺伝子を得た。この遺伝子の産物であるペプチドをCT-2と名付けた。

CRSP-2のアミノ酸配列は、アミノ酸の3文字コードで示すと次のようになる。

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Ser-Cys-Val-Thr-His-	10
Lys-Met-Thr-Gly-Trp-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-	20

Ser-Val-Ala-Lys-Asn-Asn-Phe-Met-Pro-Thr- 30

Asn-Val-Asp-Ser-Lys-Ile-Leu-NH₂ 37

CRSP-3のアミノ酸配列は、アミノ酸の3文字コードで示すと次のようになる。

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Ile-Cys-Val-Thr-His- 10

Lys-Met-Ala-Gly-Trp-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly- 20

Ser-Val-Val-Lys-Asn-Asn-Phe-Met-Pro-Ile- 30

Asn-Met-Gly-Ser-Lys-Val-Leu-NH₂ 37

CT-2のアミノ酸配列は、アミノ酸の3文字コードで示すと次のようになる。

Glu-Cys-Asn-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu- 10

Gly-Thr-Tyr-Thr-Trp-Asp-Val-Asn-Lys-Phe- 20

Tyr-Ala-Phe-Pro-Leu-Thr-Thr-Thr-Gly-Ile- 30

Arg-Val-Ser-NH₂ 33

CRSP-2のアミノ酸配列を後記配列表の配列番号12に示し、そのcDNAの塩基配列を配列番号13に、そのcDNAに基づくペプチド（前駆体ペプチド）のアミノ酸配列を配列番号14にそれぞれ示す。また、CRSP-2遺伝子の塩基配列を配列番号15に示す。

CRSP-3のアミノ酸配列を配列表の配列番号16に示し、そのcDNAの塩基配列を配列番号17に、そのcDNAに基づくペプチド（前駆体ペプチド）のアミノ酸配列を配列番号18にそれぞれ示す。

CT-2のアミノ酸配列を配列表の配列番号19に示し、そのcDNAの塩基配列を配列番号20に、そのcDNAに基づくペプチド（前駆体ペプチド）のアミノ酸配列を配列番号21にそれぞれ示す。また、CRSP-3遺伝子及びCT-2遺伝子の塩基配列を配列番号22に示す。

第1図に本発明のペプチドの例としてブタCRSPの構造を模式的に示す。この例のペプチドの場合は、2番目のCysと7番目のCysが-S-S-結合している。

また、第2図に、本発明のブタCRSP（pCRSP）、ブタカルシトニン遺伝子関連ペプチド（pCGRP-I）、ヒトカルシトニン遺伝子関連ペプチドI

(hCGRP-I)、ヒトカルシトニン遺伝子関連ペプチドII (hCGRP-II)、ヒトアミリン (hAmylin)、ブタカルシトニン (pCT)、及びヒトアドレノメデュリン (hAM) のアミノ酸配列を比較したものを示す。

本発明の、CRSPはブタカルシトニン遺伝子関連ペプチド (pCGRP) と 71.1%、ヒトCGRP-I と 63.2%、ヒトCGRP-II と 71.1% とそれぞれアミノ酸配列上の相同性を有している。

また、ブタ由来のペプチドについて、各CRSPとCRGPやAM、CT-2 とCTのアミノ酸の比較を行ったものを第23図に示す。

次にCRSPの発現部位を調べるためにノーザンブロッティングを行った結果を第3図に図面に代わる写真で示す。第3図中の矢印は、CRSP mRNA の位置を示している。また、各組織のペプチドの含有量をCRSPの抗体を用いてラジオイムノアッセイにより測定した。この測定結果を次の表1に示す。

表 1

ラジオイムノアッセイで測定したCRSP の組織含量

組織	CRSP の免疫活性 (pmol/g 組織)		
大脳皮質	0.29	±	0.04
小脳	0.18	±	0.02
中脳	7.5	±	0.9
海馬	0.78	±	0.16
尾状核	1.3	±	0.1
視床	3.5	±	0.4
視床下部	9.9	±	1.2
橋・延髄	2.2	±	0.3
脊髄	0.52	±	0.06
嗅球	0.74	±	0.22
下垂体前葉	14	±	2
下垂体後葉	96	±	15
肺	0.11	±	0.00
副腎	0.42	±	0.05
腎臓・皮質	0.12	±	0.01
腎臓・髄質	0.088	±	0.039
肝臓	0.13	±	0.02
脾臓	0.11	±	0.01
胃	0.29	±	0.00
小腸	0.072	±	0.018
膵臓	0.066	±	0.010
甲状腺	68	±	39
卵巣	0.18	±	0.09
心房	0.20	±	0.04
心室	0.21	±	0.09
大動脈	0.33	±	0.19

各数値は平均値 ± 標準誤差 (n=3)を表す

この結果、本発明のCRSPは、中枢神経系においては中脳、視床下部に、末梢においては甲状腺に多くの遺伝子発現がみられた。また橋・延髄にも中程度の発現が見られ、大脳、下垂体においても僅かではあるが発現が観察される。一方組織含量は下垂体後葉、甲状腺が最も多く、中脳、視床下部、下垂体前葉にも高い組織含量が観察された。

次に、CRSPの生理活性について検討した。

まず、LLC-PK₁細胞を用いてCRSPのcAMP産生活性を検討した。LLC-PK₁細胞の培地にDMEMに溶解したCRSPを添加して、分泌されてきたcAMPの量をcAMP特異的な抗体を用いたラジオイムノアッセイにより定量した。結果を第4図に示す。第4図の縦軸はcAMPの産生量(pmol/10⁵細胞/30分)を示し、横軸は各ペプチドの濃度の逆対数(-log(ペプチド濃度(M)))を示す。第4図の黒丸(●)は本発明のCRSPを示し、白丸(○)はブタカルシトニン遺伝子関連ペプチド(pig CGRP)を示し、白菱形(◇)はブタカルシトニン(pig CT)をそれぞれ示す。この結果、本発明のCRSPは、ブタ腎上皮細胞由来のLLC-PK₁細胞の細胞内アデニル酸シクラーゼ活性を濃度依存的に非常に強く(ED₅₀は約1.5 nM)上昇させる。この活性はブタカルシトニン(ED₅₀は約8.7 nM)より約6倍、ブタCGRP(ED₅₀は約62 nM)より約40倍強かった。

次に本発明のCRSPのナトリウムイオン、カルシウムイオンの取り込みの促進作用を検討した。

LLC-PK₁細胞の培養液をハंकスー塩化コリン液に置換し、一定量の放射活性をもつ塩化ナトリウム(²²Na)及びCRSPをそれぞれ終濃度0 M、10⁻⁸ M、10⁻⁷ M、10⁻⁶ Mになるように添加し、10分後、細胞を洗浄して細胞外液に含まれる²²Naを完全に除去し、細胞内に取り込まれた放射活性をガンマカウンターにより測定した。また同様にLLC-PK₁細胞の培養液をハंकスー塩化コリン液に置換し、一定量の放射活性を持つ塩化ナトリウム(²²Na)及びそれぞれCRSPとNa/H共輸送体阻害剤であるアミロライド誘導体5-(N-エチル-N-イソプロピル)-アミロライド(5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride (EIPA))を終濃度CRSP 0 M+EIPA 0 M、CRSP 10

10^{-6} M + EIPA 0M、CRSP 10^{-6} M + EIPA 10^{-8} M、CRSP 10^{-6} M + EIPA 10^{-7} M、CRSP 10^{-6} M + EIPA 10^{-6} M、CRSP 0M + EIPA 10^{-6} Mとなるよう添加し、10分後、細胞を洗浄して細胞外液に含まれる ^{22}Na を完全に除去し、細胞内に取り込まれた放射活性をガンマカウンターにより測定した。

結果を第5図（EIPA非存在下でのナトリウムイオンの取り込み）、第6図（EIPA存在下でのナトリウムイオンの取り込み）、及び第7図（カルシウムイオンの取り込み）にそれぞれ示す。第5図、第6図及び第7図の縦軸は各イオンの取り込み量（cpm）を示し、横軸に左端はコントロール（ペプチド無添加）を示し、その右は各濃度のCRSPを示す。第6図の横軸のコントロールの右はCRSP単独投与の場合を示し、その右はCRSPとEIPAの共投与の各濃度を示し、右端はEIPA単独投与の場合を示す。第7図中のsCTは、サケカルシトニンを示す。第5図、第6図、及び第7図中、*印は $p < 0.05$ で、*印は $p < 0.01$ で、***印は $p < 0.001$ で有意差があったことを示す。

この結果、CRSPはLLC-PK₁細胞上のアミロライド感受性Na/H共輸送体を活性化して細胞内へのナトリウムの取り込みを促進する。また細胞内へのカルシウムの取り込みを抑制することがわかった。

次にCRSPによる細胞増殖の抑制作用について検討した。

LLC-PK₁細胞に各濃度の各ペプチドのDMEM溶液を添加し、 ^{125}I で標識したプロモデオキシウリジンを含むDMEM（0.1% BSAを含む）を各ウェルに添加して、5時間後核内に取り込まれた放射活性をガンマカウンターにより測定し、細胞増殖に伴って合成されたDNA量を測定した。結果を第8図に示す。第8図の縦軸は ^{125}I -DUの取り込み量（ $\times 100$ cpm/ウェル）を示し、横軸は各ペプチドの濃度の逆対数（ $-\log$ （ペプチド濃度(M)））を示す。第8図の黒丸（●）は本発明のCRSPを示し、白丸（○）はブタカルシトニン（ブタCT）を示し、白菱形（◇）はサケカルシトニン（サケCT）をそれぞれ示す。

また、細胞の増殖数は、10,000細胞/ウェルのLLC-PK₁細胞に各濃度のCRSPのDMEM溶液を添加し、培養後、培養皿上の細胞をトリプシン-E

DTA溶液で剥がし、細胞数を計数板にて計測した。結果を第9図に示す。第9図の縦軸は細胞数 ($\times 1,000$ 細胞/ウエル) を示し、横軸は左端はコントロール (CRSP 無添加) を示し、その右は各濃度の CRSP を示す。*印は $p < 0.05$ で有意差があったことを示す。

これらの結果、CRSP は LLC-PK₁ 細胞の増殖を抑制する作用を有することがわかった。

次に、本発明の CRSP によるカルシトニン受容体への作用を検討した。

ブタカルシトニン受容体 (CTR) を哺乳類発現ベクター pcDNA3.1 に導入し、アカゲザル腎細胞 (COS-7) に発現させて CRSP 刺激による cAMP 産生量をラジオイムノアッセイにより測定した。同様にオボッサム腎細胞 (OK細胞) に CTR を発現させて CRSP 刺激による cAMP 産生量をラジオイムノアッセイ法により、ナトリウムイオンの取り込みを放射活性を持つ塩化ナトリウム (^{22}Na) の取り込みをガンマカウンターで計測することにより測定した。結果を第10図 (遺伝子工学的にカルシトニン受容体を発現している細胞 (COS-7) の CRSP 刺激による cAMP 産生能の変化)、第11図 (ブタカルシトニン受容体 (CTR) を発現させたオボッサム腎上皮細胞の cAMP 産生能の変化)、及び第12図 (ブタカルシトニン受容体 (CTR) を発現させたオボッサム腎上皮細胞のナトリウムイオンの取り込みの変化) に示す。

第10図の縦軸は cAMP の産生量 ($\text{pmol}/\text{ウエル}/30\text{分}$) を示し、横軸は各ペプチド (リガンド) の濃度の逆対数 ($-\log(\text{リガンド濃度(M)})$) を示す。第10図の黒丸 (●) は本発明の CRSP を示し、白菱形 (◇) はブタカルシトニン (pCT) をそれぞれ示す。第11図の縦軸は cAMP の産生量 ($\text{fmol}/\text{ウエル}/1\text{時間}$) を示し、横軸は CRSP の濃度の逆対数 ($-\log(\text{CRSP 濃度(M)})$) を示す。第11図の黒丸 (●) はブタカルシトニン受容体 (CTR) を導入したオボッサム腎上皮細胞の場合を示し、黒四角 (■) はオボッサム腎上皮細胞 (OK細胞) の場合を示す。第12図の縦軸はナトリウムイオンの取り込み量の比 (コントロールを100とする) を示し、横軸は CRSP の濃度の逆対数 ($-\log(\text{CRSP 濃度(M)})$) を示す。第12図の黒丸 (●) はブタカルシトニン受容体 (CTR) を導入したオボッサム腎上皮細胞の

場合を示し、黒四角 (■) はオボッサム腎上皮細胞 (OK細胞) の場合を示す。第12図において、***印は $p < 0.001$ で有意差があったことを示す。

この結果、CTRをCOS-7に発現させてCRSPで刺激すると、細胞内アデニル酸シクラーゼ活性が上昇 (ED_{50} は約 0.2 nM) する。この活性はブタカルシトニン (ED_{50} は約 71 nM) より約350倍強かった。CRSPのこの作用はブタのカルシトニンより約350倍も強力で、既知の生理活性ペプチドの中で最も強いものである。同様にオボッサム腎上皮細胞 (OK細胞) にCTRを発現させてCRSPで刺激すると、細胞内アデニル酸シクラーゼ活性が上昇すると同時にアミロライド感受性 Na/H 共輸送体を活性化して細胞内へのナトリウムの取り込みを促進する効果が観察された。

さらに、CRSPのラットの血圧及び血漿中イオン濃度の変化について検討した。

生理食塩水に溶解した 16 nmol/kg に相当する量のCRSPを麻酔条件下でラット頸静脈より短期間に一度に投与して、血漿中カルシウム濃度及び血圧を測定した。結果を第13図 (CRSP投与による血中カルシウム濃度の変化) 及び第14図 (CRSP投与による血圧の変化) に示す。第13図の縦軸は血中カルシウム濃度 (mM) を示し、横軸は時間 (分) を示す。第14図の縦軸は血圧 (mmHg) を示し、横軸は時間 (分) を示す。第13図中の**印は $p < 0.01$ で有意差があったことを示す。

この結果、CRSPの投与により、一過性に血漿中カルシウム濃度が低下するが、一方血圧に対しては明確な変動を及ぼさないことがわかった。

続いて、CRSPとCRSP-GlyのcAMP産生促進活性の違いについて検討した。

ブタカルシトニン受容体 (CTR) を哺乳類発現ベクター $\text{pcDNA}3.1$ に導入し、アカゲザル腎細胞 (COS-7) に発現させてCRSP刺激によるcAMP産生量をラジオイムノアッセイにより測定した。結果を第15図に示す。

この結果、CRSPとCRSP-Glyはほぼ同等のcAMP産生活性を有することがわかった。

また、ウシ及びイヌから単離してきた本発明のペプチド (ウシCRSP及びイ

ヌCRSP)について、前記したのと同様にしてLLC-PK₁細胞を用いたCRSPのcAMP産生活性を検討した。結果を第16図に示す。第16図の縦軸はcAMPの産生量(pmol/ウェル/10分)を示し、横軸は添加したCRSPの濃度を示す。

この結果、ウシやイヌのCRSPでもブタCRSPの場合とほぼ同様な結果が得られることがわかった。

本発明のペプチドの各種、CRSP、CRSP-2、CRSP-3、CT-2、CT、CGRP、GAPDHの遺伝子発現量をRT-PCRによる高感度定量により測定した。その結果を第24図に示す。

CRSP-2及びCRSP-3は中枢及び甲状腺、卵巣に発現が観察された。一方CT-2は何れの組織でもバンドが増幅されず、発現が観察されなかった。CT-2は第24図に示された組織以外に限局して発現しているものと考えられる。

以上のように、本発明のペプチドは、カルシトニンより強くカルシトニン受容体を刺激し、アデニル酸シクラーゼを活性化することが示された。このことは、本発明のペプチドがカルシトニン受容体の真の内因性のリガンドであることを示している。

従って、本発明のペプチドは、末梢の組織のカルシトニン受容体に作用して以下のような薬効を奏するものと考えられる。

カルシトニンはその受容体であるカルシトニン受容体を介して骨へのカルシウムの取り込みを促進させる。本発明のペプチドはカルシトニンと同様にカルシトニン受容体に作用して骨へのカルシウムの取り込みを促進させると考えられる。実際に第13図で示したようにラットにおいてこのペプチドの投与により、血漿中のカルシウム濃度の減少が観察された。この結果は骨へのカルシウムの取り込みの促進を裏付けていると考えられる。この作用を利用して骨粗鬆症により低下した骨密度を健常状態に回復させるための薬剤として利用が可能であり、骨粗鬆症の予防・治療剤として使用することができる。

また第13図に示されるように、本ペプチドは、血漿中のカルシウム濃度を低下させる活性を持っており、アルカローシス等に伴う高カルシウム血症の血漿中

カルシウム濃度を通常レベルにまで下げるための薬剤への応用が可能であり、高カルシウム血症の治療・予防剤として使用することができる。

本ペプチドは、腎上皮細胞のアミロライド感受性Na/H共輸送体の作用を活性化する。これはカリウム保持性の利尿剤であるアミロライドの反対方向の活性であり、抗利尿剤として使用できる。

本発明のペプチドは、第8図及び第9図で示したようにカルシトニン受容体を介して腎上皮細胞の増殖を強く抑制する。カルシトニンはカルシトニン受容体を介して腺ガン細胞等の増殖を強く抑制する事が報告されている(Cancer Res. 1985, 45, 4890-4894 他)ため、同様に本発明のペプチドもカルシトニン受容体を介してこれらのガン細胞の増殖をカルシトニンよりも強力に抑制すると考えられ、ガンの治療、予防薬として使用できる。

本発明のペプチドは、中枢に大量に発現していることが示された。従来から知られてきたアゴニストであるカルシトニンは中枢における発現が認められず、一方カルシトニン受容体は中枢に発現しているため、この事は本発明のペプチドが中枢における真の内因性リガンドであることを示している。カルシトニンを脳室内に投与すると、食欲の抑制、鎮痛作用を示すことが報告されている。カルシトニンは脳内に発現していないため、本ペプチドが脳内でこれらの作用を担っているものと考えられる。

したがって、本発明のペプチドは、中枢神経系のカルシトニン受容体に作用して以下のような薬効を奏するものと考えられる。

カルシトニンは中枢神経系で食欲の抑制に働いていることが報告されている(Science 1979, 206, 850-852, THE BONE 1992, 6, 69-74 他)。カルシトニン受容体をカルシトニンよりも強く活性化できる本発明のペプチドは強い食欲抑制作用を示す可能性が強い。本発明のペプチドの投与により肥満及びそれに伴う疾患(高血圧、高脂血症等)の治療・予防薬として使用することができる。

さらに、従来よりカルシトニン製剤がガンの転移や骨粗鬆症等による骨の痛み、偏頭痛、肺炎による痛み等に対し鎮痛作用を示すことが報告されている(Am. J. Med. Sci. 1997, 313, 13-16 他)。カルシトニン受容体をカルシトニンよりも強く活性化する本発明のペプチドは、カルシトニンと同様に強い鎮痛作用を示す可

能性が高く、これらの痛みに対する鎮痛剤として有効性を有する。

本発明のペプチドは、（１）中枢神経系において発現し、（２）カルシトニン受容体に強く作用する性質、（３）細胞のcAMP産生能を促進させる性質を有し、少なくとも次ぎのアミノ酸配列、

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-	10
Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-	20
Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-	30
Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Phe-Gly	38

又はこれらのアミノ酸配列の一部のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加したアミノ酸配列を有するペプチドに関する。本発明のペプチドは、前記したアミノ酸配列を有しておれば、そのアミド誘導体、エステル誘導体、又は各アミノ酸の側鎖の官能基、例えばリジンのアミノ基、セリンの水酸基などの誘導体を包含するものである。本発明のより好ましいペプチドは、さらに（４）ナトリウムイオンを濃度依存的に取り込む性質、（５）カルシウムイオンの取り込みを抑制する性質、及び（６）細胞増殖を抑制する性質を有するペプチドに関する。

本発明のペプチドは、前記した（１）～（３）の性質、好ましくは（１）～（６）の性質を有するものであれば、前記したアミノ酸配列に限定されるものではなく、当該アミノ酸配列における一部のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加したアミノ酸配列を有するペプチドであってもよい。このようなアミノ酸配列としては、５０％以上の相同性を有するものが好ましいが、さらに７５％以上、８０％以上、さらには８５％以上の相同性を有するものであってもよいが、これに限定されるものではない。さらに、本発明の好ましいペプチドのアミノ酸配列としては、カルシトニンやカルシトニン遺伝子関連ペプチドのアミノ酸配列と５０％以上、好ましくは６０％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。

また、前記した例ではブタからの本発明のペプチドであるCRSPを示してきたが、本発明のペプチドはブタ由来のものに限定されるものではなく、ヒト、ラット、イヌ、ウシなどの哺乳動物、サケなどの魚類動物などに由来するペプチドを包含している。

本発明のペプチドは、天然から抽出などの操作により、分離精製することもできる。また、通常のペプチド合成法により合成することもできる。さらに、本発明の遺伝子を適当なベクターに組み込んで、原核細胞や真核細胞を宿主細胞として遺伝子組換え技術により製造することもできる。

本発明の医薬組成物は、本発明のペプチドと製薬上許容される担体からなるものである。本発明の医薬組成物は、非経口投与又は経口投与することができ、好ましくは静脈投与、筋肉投与などの非経口投与される。

本発明の医薬組成物は、注射用製剤、凍結乾燥製剤、直腸投与製剤などに製剤化することができる。また、貼付デバイス、軟膏、貼付剤などの外用剤として製剤化することもできる。さらに、舌下錠として製剤化することもできる。製剤化は通常のペプチド製剤の方法により行うことができる。

本発明の医薬組成物は、有効成分として本発明のペプチドのほかに他の有効成分を組み合わせ使用することもできる。本発明の医薬組成物の投与量としては、有効成分の本発明のペプチドの量として、通常は1日、体重あたり $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 1000 \text{mg}/\text{kg}$ 、好ましくは $0.1 \text{mg}/\text{kg} \sim 500 \text{mg}/\text{kg}$ の範囲で投与することができるが、患者の性状や疾患の症状に応じて適宜変更することができる。本発明のペプチドは、カルシトニンよりも強くカルシトニン受容体に作用するものであることから、従来のカルシトニン製剤と同様に疾患に適用することもできる。

本発明のペプチドはまた、カルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）に相同性を有するペプチドも含まれるため、上記に記載した目的で利用できるのみならず、CGRPに類似した生理活性を利用することが可能である。

CGRPの生理活性としては、CGRP受容体に強く作用し、細胞内のcAMP産生を促進させる作用が知られている。また、CGRPは血管の弛緩作用を揺ること（Regul. Pept. 1986, 15, 1-23等）、利尿を促進させること（Proc Soc Exp Biol Med 1998, 188, 316-322等）、血管内皮細胞や血管平滑筋、線維芽細胞などの細胞の増殖能を変化させること（Proc Natl Acad Sci USA. 1990, 87, 3299-3303; Regul Pept 2001, 101, 169-178等）が報告されている。

したがって、本発明のペプチドのなかのある種のもの、特にCGRPとの相同

性の高いペプチドについては、（１）中枢神経系において発現し、（２）カルシトニン受容体に強く作用し、（３）細胞のcAMP産生能を促進させ、（４）ナトリウムイオンを濃度依存的に取り込む作用を有し、（５）カルシウムイオンの取り込みを抑制し、（６）細胞増殖を抑制する作用を有する、ことに加え、

（７）カルシトニン関連ペプチド受容体に強く作用し、（８）血管の弛緩作用を有し、（９）利尿を促進させ、（１０）血管内皮細胞や血管平滑筋、線維芽細胞の増殖能を変化させる作用などのCGRPが有する作用と類似する作用も合わせ持つものであることが期待されるが、必ずしも本発明のペプチドのすべてが（７）～（１０）に示される作用を有するものではない。

このようなCGRPの有する作用に基づけば、本発明のペプチドを含む医薬組成物は、前記した本発明の医薬組成物の使用法の他に次の目的に使用する製剤として利用可能である。すなわち、血管の弛緩作用を直接利用した降圧剤、中枢及び末梢神経系を介した血管弛緩作用を利用した降圧剤、利尿剤、血管平滑筋の増殖の抑制を利用したPTCA（経皮的冠動脈形成術）後の再狭窄を防ぐための薬剤などとしても使用できる可能性がある。

なお、特願2002-162797明細書に記載された内容を、本明細書にすべて取り込む。

実施例

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

実施例1 （CRSPペプチドの抽出、単離）

ブタ脳20kgを4倍量の水中で10分間煮沸し、冷却後、最終的に1Mになるよう酢酸を添加してホモジェナイズし、遠心分離で不溶物を除去してブタ脳抽出液を作成した。これを限外濾過（ペリコンカセットPLAC #000-05, ミリポア社）で脱塩し、脱塩後の抽出液に氷冷下、終濃度6.6%になるようにアセトンをゆっくり加えた。沈殿を遠心分離により除去し、上精をエバポレーターによりア

セトンを除去した後、逆相のカラム (LC-SORB SPW-C-ODS、ケムコ、1.5 l) に吸着させた。カラムを3倍量の0.5 M酢酸で洗浄した後、3倍量の溶出バッファー (水：アセトニトリル：10%トリフルオロ酢酸=40：60：1) でペプチド画分を溶出した。溶出液はエバポレーターによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥した。

凍結乾燥標品は秤量後1 M酢酸に溶解し、陽イオン交換樹脂 (SP-Sephadex、ファルマシア社、3×28 cm) の充填されたオープンカラムに吸着させ、素通り画分 (SP-I)、2 Mピリジン (pH 8.0) で溶出された溶出画分 (SP-II)、2 Mピリジン-酢酸 (pH 5.0) で溶出された画分 (SP-III) に分画し、SP-III 強イオン性画分を得た。この画分を凍結乾燥した後1 M酢酸に溶解し、ゲル濾過 (Sephadex G-50、ファルマシア社、7.5×145 cm、1 M酢酸、流速100 ml/h) で分子量に応じてフラクションに分画し、分子量1 kDaから5 kDaに相当する部分を集めた。これを再びゲル濾過 (Sephadex G-25、ファルマシア社、7.5×145 cm、1 M酢酸、流速100 ml/h) で、分子量に応じた画分に分離し、分子量2 kDaから4 kDaに相当する部分を集め、凍結乾燥した。

凍結乾燥標品をイオン交換クロマトグラフィー (CM52、Whatman社、2.4×45 cm、A液：10 mMギ酸アンモニウム (pH 6.5)：アセトニトリル=9：1、B液：1 Mギ酸アンモニウム (pH 6.5)：アセトニトリル=9：1、流速35 ml/h) を用いて、10 mMから0.5 Mまでギ酸アンモニウムによる濃度勾配溶出を行った。

ここで各画分の1/1000量を凍結乾燥し、凍結乾燥標品をダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM、0.05%牛血清アルブミンを含む) に溶解した培地でブタ腎臓由来の上皮細胞LLC-PK₁を刺激して37℃1時間インキュベーションし、培地に分泌されるcAMP量をラジオイムノアッセイにより定量した。

方法は未知量のcAMPを含む培地及び既知濃度のcAMPを含む培地100 μlに、4%になるように無水コハク酸を溶解したジオキサントリエチルアミン混合液 (ジオキサン：トリエチルアミン=4：1) を等量加え、30分間室温で放置してcAMPをサクシニル化し、遠心エバポレーターで乾固した後、1 mlの緩衝液 (50 mM酢酸ナトリウム (pH 6.2)、1 mM EDTA、0.0

25%アジ化ナトリウム、0.5%血清アルブミン、0.01%Triton X-100)に溶解し、その内100 μ lずつを試験管に取り分け、50 μ lずつ放射性標識したサクシニル化cAMP及び抗体を加え、4℃で48時間放置した。次に100 μ lの1% γ -グロブリン及び500 μ lの25%ポリエチレングリコールを添加してよく混和し、遠心分離を行って沈殿の放射活性をガンマカウンターを用いて測定し、既知濃度のcAMPにより作成した標準曲線の放射活性と比較することでcAMP量を定量した。

cAMP量の上昇が観察された画分(ギ酸アンモニウム(pH6.5)約0.3M)をさらに陽イオン交換HPLC(TSK-gel CM-2SW、東ソー、7.8 \times 300mm、A液:10mMギ酸アンモニウム(pH3.8):アセトニトリル=9:1、B液:1Mギ酸アンモニウム(pH3.8):アセトニトリル=9:1、流速2ml/min)でギ酸アンモニウムの濃度勾配溶出を行った。再びそれぞれの画分の1/1000量を取り、活性を測定し、活性の観察された画分(ギ酸アンモニウム(pH3.8)約0.36M)を、さらに逆相HPLC(C₁₈ 218TP54、Vydac社、4.6 \times 250mm、A液:水:アセトニトリル:10%トリフルオロ酢酸=90:10:1、B液:水:アセトニトリル:10%トリフルオロ酢酸=40:60:1、流速1ml/min)でアセトニトリルによる濃度勾配溶出を行い、活性を持つ画分(アセトニトリル約32%)を得た。これを再び逆相HPLC(diphenyl 219TP5215、Vydac社、2.1 \times 150mm、A液:水:アセトニトリル:10%トリフルオロ酢酸=90:10:1、B液:水:アセトニトリル:10%トリフルオロ酢酸=40:60:1、流速0.2ml/min)にて分離し、(アセトニトリル約29%)最終的な精製標品を得た。

約50pmolのペプチドが得られた。このペプチドの分子量は4099で理論上の等電点は12.81と算出された。また上述の通りVydac社のC₁₈カラム(4.6 \times 250mm、218TP54)で0.1%TFA存在下、アセトニトリル濃度約32%で溶出される程度の疎水性を持っていた。

実施例2 (CRSPのアミノ酸配列の決定)

アミノ酸配列はエドマン法による自動アミノ酸シーケンサーを用いて決定した。まず、5 pmolの精製標品をN末端からアミノ酸シーケンサーを用いて解析し、Ser-Xaa-Asn-Thr-Ala-Thr-Xaa-Met-Thr-His-Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-Ser-Met-Valを決定した。次に10 pmolの精製標品をトリプシン分解し、逆相HPLC (C₁₈ 218TP5215、Vydac社、2.1×150mm、A液：水：アセトニトリル：10%トリフルオロ酢酸=90：10：1、B液：水：アセトニトリル：10%トリフルオロ酢酸=40：60：1、流速0.2 ml/min) でアセトニトリルによる濃度勾配溶出を行った。得られたピークをアミノ酸シーケンサーで解析し、

Ser-Xaa-Asn-Thr-Ala-Thr-Xaa-Met-Thr-His-Arg、

Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg、

Ser-Gly-Ser-Met-Val-Arg、

Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-Lys、

Met-Gly-Phe-Lys、

Val-Phe

の6個のシーケンスを得ることができた。これらの配列とデータベースとの比較から本ペプチドがカルシトニン遺伝子関連ペプチドと相同性を持ち、このペプチドが

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Phe-NH₂

という配列であると考えられた。

一方、質量分析計により分子量を測定したところ、4130.6±0.7 Daという結果が得られた。これはアミノ酸配列から予想される4042 Daと約89 Da異なっていたが、この差異は2個のメチオニンの酸化(16 Da×2)とアミノ酸シーケンサーで判読できなかったC末端のグリシン(57 Da)の存在によるものではないかと予想された。最終的には次の実施例3よりこれらの予想通りに、

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-

Arg-Ser-Gly-Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-Lys-Met-Gly-Phe-
Lys-Val-Phe-Gly-NH₂

(2番目のCysと7番目のCysの間でジスルフィド結合を形成する。)

であることが明らかになった。

得られたCRSPのアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示し、CRSP-Glyのアミノ酸配列を配列番号2に示す。

実施例3 (相補的DNA塩基配列及び前駆体アミノ酸配列)

プローブは実施例2のアミノ酸配列を基にN末端側

(TG(C/T)AA(C/T)AC(A/C/G/T)GC(A/C/G/T)AC(A/C/G/T)TG(C/T)ATGAC)

及びC末端側

(CC(A/G)AA(A/C/G/T)AC(C/T)TT(A/G)AA(A/C/G/T)CCCATA)

で合成プライマーを作成し、ブタ遺伝子を鋳型にPCR法で増幅することにより作成した。

相補的DNA λファージライブラリーはブタ視床下部mRNA (3 μg) よりファルマシア社Time saver cDNA作成キット及びStratagene社のλZAP IIを用いて作成した。スクリーニングの方法は大腸菌をλファージ (約10万個の独立したクローンを持つ) に感染させてLB培地を含む0.7%アガロースと混合し、LB培地を含む1.5%寒天培地を敷いた培養皿に播き、37℃で8時間ほど培養した。冷蔵庫で2時間ほど冷却した後、形成したプラークをナイロンフィルターに転写し、アルカリ変性 (0.5 M水酸化ナトリウム + 1.5 M塩化ナトリウム溶液で2分間、0.5 Mトリス-塩酸塩 (pH 7.5) + 1.5 M塩化ナトリウム溶液で2分間、45 mMクエン酸ナトリウム (pH 7.0) + 450 mM塩化ナトリウムで5分間処理を行う) 後、フィルターを80℃で2時間乾燥させた。次に乾燥したフィルターをプレハイブリダイゼーション液 (50%ホルムアミド、0.09 Mクエン酸ナトリウム (pH 7.0)、0.9 M塩化ナトリウム、0.5%牛血清アルブミン、0.5%フィコール、0.5%ポリビニルピロリドン、0.5%ラウリル硫酸ナトリウム) に37℃で2時間浸し、そこに³²Pで標識したプローブを加え、42℃で16時間ハイブリダイゼーションを行う。フィルタ

一は洗浄液で洗浄（30 mMクエン酸ナトリウム（pH 7.0）、300 mM塩化ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、室温5分間を2回、30 mMクエン酸ナトリウム（pH 7.0）、30 mM塩化ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、65℃1時間を2回行う）後、X線フィルムに感光させ、放射線により感光する部分を培養皿上のプラークと照合し、プラークから陽性クローンを単離した。

単離された陽性入ファージクローンはStratagene社ヘルパーファージR408を用いてDNAシーケンスに適したベクターであるプラスミドpBlue-scriptに変換し、塩基配列はサンガー法により決定した。

決定された塩基配列を配列表の配列番号3に示し、そのアミノ酸配列を配列番号4に示す。

得られたCRSPは、ブタカルシトニン（CT）遺伝子関連ペプチド（CGRP）と71.1%、ヒトCGRP-Iと63.2%、ヒトCGRP-IIと71.1%のアミノ酸配列上の相同性を有していた（第2図参照）。

実施例4 （発現部位）

遺伝子の発現量のためのRNAの調製は酸性グアニジンフェノールクロロホルム抽出法により行った。約1gのブタ組織を5mlの変性液（4Mグアニジンチオシアン塩、25mMクエン酸ナトリウム（pH 7.0）、0.1M 2-メルカプトエタノール、0.5%サルコシン酸ナトリウム）でホモジェナイズし、1/10量の2M酢酸ナトリウム、等量の水飽和フェノール、1/5量のクロロホルムを加えよく攪拌した後、遠心分離を行った。次に水層を分離してそこに等量の2-プロパノールを加えよく攪拌し-20℃で1時間静置し、再び遠心分離し、沈殿（RNA）を回収した。このRNAのうち30μgをホルムアルデヒド-アガロース変性ゲル（1%アガロース、2.2Mホルムアルデヒド、20mM Mops（pH 7）、8mM酢酸ナトリウム、1mM EDTA）を用いて電気泳動を行い、泳動後のゲルを十分水洗してホルムアルデヒドを除去した後、0.05M水酸化ナトリウムに15分間、0.3Mクエン酸ナトリウム（pH 7）+3M塩化ナトリウム溶液で45分間処理した。次にゲルに含まれるRNAをキャピ

ラリブロット法でナイロンフィルターに転写し、RNAを転写したフィルターを80℃で乾燥させた。次にフィルターをAmbion社のULTRAhybハイブリダイゼーション液に37℃2時間浸した後、CRSPを暗号化している部分(cDNA上の346番目-488番目の間の塩基対)を³²Pで標識したプローブを加え、42℃で16時間ハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーション後、フィルターを洗浄液で洗浄(30mM クエン酸ナトリウム(pH7.0)、300mM塩化ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、室温5分間を2回、1.5mMクエン酸ナトリウム(pH7.0)、15mM塩化ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、65℃1時間を2回行う)後、X線フィルムに感光させ、RNAの定量を行った。

結果を第3図に示す。

実施例5 (発現量の測定)

各組織のペプチド含量は合成ペプチドに対して作成した抗体を利用してラジオイムノアッセイにより測定した。組織約1gを10倍量の水で煮沸し、氷冷後酢酸を1Mになるよう加え、ホモジェナイズ後、遠心分離により不溶物を除去して抽出液を作成した。この抽出液を凍結乾燥後、緩衝液(50mMリン酸ナトリウム(pH7.4)80mM塩化ナトリウム、25mMEDTA、0.5%Triton X-100、0.5%牛血清アルブミン0.05%アジ化ナトリウム)に溶解し、100μlずつ試験管に取り分けた。これらのCRSPを含む緩衝液及び既知濃度のCRSPを溶解した緩衝液に等量の放射性標識したCRSP及び抗体を加えて攪拌し、48時間4℃で静置した後、100μlのγ-globulin及び500μlの23%ポリエチレングリコールを添加してよく混和し、遠心後、沈殿の放射活性を既知濃度のCRSPにより作成した標準曲線の放射活性と比較することでCRSP量を定量した。

結果を前記した表1に示す。

実施例6 (LLC-PK₁細胞におけるCRSPのcAMP産生促進作用)

LLC-PK₁細胞を栄養培地(10%牛胎児血清を含むダルベッコ改変イーグ

ル培地 (DMEM)) 中で培養し、2日後、0.05%牛血清アルブミンを含む DMEM に溶解した CRSP を細胞の栄養培地と置き換えて30分間インキュベーション後、培地を回収して、分泌されてきた cAMP の量を cAMP 特異的な抗体を用いたラジオイムノアッセイにより定量した。

結果を第4図に示す。

実施例7 (LLC-PK₁細胞におけるCRSP存在下でのナトリウムイオン、カルシウムイオンの取り込みの作用)

LLC-PK₁細胞を6ウェル培養皿上、DMEM (10%FCSを含む) 中で2日間培養した。ナトリウムイオンの取り込みの測定は以下に行った。

LLC-PK₁細胞の培養液をハंकスー塩化コリン液に置換し、一定量の放射活性をもつ塩化ナトリウム (^{22}Na) 及びCRSPをそれぞれ終濃度0M、 10^{-8}M 、 10^{-7}M 、 10^{-6}M になるように添加し、10分後、細胞を洗浄して細胞外液に含まれる ^{22}Na を完全に除去し、細胞内に取り込まれた放射活性をガンマカウンターにより測定した。また同様にLLC-PK₁細胞の培養液をハंकスー塩化コリン液に置換し、一定量の放射活性を持つ塩化ナトリウム (^{22}Na) 及びそれぞれCRSPとNa/H共輸送体阻害剤であるアミロライド誘導体5-(N-エチル-N-イソプロピル)-アミロライド (5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride (EIPA)) を終濃度CRSP 0M+EIPA 0M、CRSP 10^{-8}M +EIPA 0M、CRSP 10^{-6}M +EIPA 10^{-8}M 、CRSP 10^{-6}M +EIPA 10^{-7}M 、CRSP 10^{-6}M +EIPA 10^{-6}M 、CRSP 0M+EIPA 10^{-6}M となるよう添加し、10分後、細胞を洗浄して細胞外液に含まれる ^{22}Na を完全に除去し、細胞内に取り込まれた放射活性をガンマカウンターにより測定した。

EIPAの非存在下における結果を第5図に、またEIPA存在下における結果を第6図にそれぞれ示す。

カルシウムイオンの取り込みは以下に行った。LLC-PK₁細胞は塩化カルシウム濃度を0mMに下げたハंकス液 (カルシウムフリーハंकス液) で洗浄した。CRSPと共に塩化カルシウム (^{45}Ca) を細胞上のカルシウムフリ

ーハンス液に添加し、10分後、細胞を洗浄して細胞外液に含まれる ^{45}Ca を完全に洗浄し、細胞内に取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターにより測定した。

結果を第7図に示す。

実施例8 (CRSPによる細胞増殖の抑制)

LLC-PK₁細胞を24ウェルコラーゲンプレート上、DMEM (10% FCSを含む) 中で2日間培養し、細胞をDMEMで一度洗った後、 $0, 10^{-12} \sim 10^{-6}\text{M}$ のCRSPを含むDMEM (10% FCSを含む) に置換し培養した。2時間後、 ^{125}I で標識したプロモデオキシウリジンを含むDMEM (0.1% BSAを含む) を各ウェルに添加して、5時間後核内に取り込まれた放射活性をガンマカウンターにより測定し、細胞増殖に伴って合成されたDNA量を測定した。

結果を第8図に示す。

同様に10,000細胞/ウェルのLLC-PK₁細胞を24ウェルコラーゲンプレートに播き、DMEM (10% FCSを含む) で24時間培養した。各ウェルをDMEMで一度洗った後、 $0\text{M}, 10^{-8}\text{M}, 10^{-6}\text{M}$ の濃度のCRSPを含むDMEM (10% FCSを含む) に培地を置換し培養した。24時間後、培養皿上の細胞をトリプシン-EDTA溶液で剥がし、細胞数を計数板にて計測した。

結果を第9図に示す。

実施例9 (カルシトニン受容体へのCRSPの作用)

ブタカルシトニン受容体 (CTR) を哺乳類発現ベクターpcDNA3.1に導入し、アカゲザル腎細胞 (COS-7) に発現させてCRSP刺激によるcAMP産生量をラジオイムノアッセイにより測定した。

結果を第10図に示す。

同様にオポッサム腎細胞 (OK細胞) にCTRを発現させてCRSP刺激によるcAMP産生量をラジオイムノアッセイ法により、ナトリウムイオンの取り込みを放射活性を持つ塩化ナトリウム (^{22}Na) の取り込みをガンマカウンターで計測することにより測定した。

結果を第 1 1 図及び第 1 2 図にそれぞれ示す。

実施例 1 0 (CRSP のラットの血圧及び血漿中イオン濃度の変化)

生理食塩水に溶解した 16 nmol/kg に相当する量の CRSP を麻酔条件下でラット頸静脈より短期間に一度に投与した。

結果を第 1 3 図及び第 1 4 図に示す。

実施例 1 1 (CRSP-Gly ペプチドの抽出、単離)

ブタ脳 20 kg を 4 倍量の水中で 10 分間煮沸し、冷却後、最終的に 1 M になるよう酢酸を添加してホモジェナイズし、遠心分離で不溶物を除去してブタ脳抽出液を作成した。これを限外濾過 (ペリコンカセット PLAC#000-05, ミリポア社) で脱塩し、脱塩後の抽出液に氷冷下、終濃度 66% になるようにアセトンをゆっくり加えた。沈殿を遠心分離により除去し、上精をエバポレーターによりアセトンを除去した後、逆相のカラム (LC-SORB SPW-C-ODS、ケムコ、 1.5 l) に吸着させた。カラムを 3 倍量の 0.5 M 酢酸で洗浄した後、3 倍量の溶出バッファー (水 : アセトニトリル : 10% トリフルオロ酢酸 = $40 : 60 : 1$) でペプチド画分を溶出した。溶出液はエバポレーターによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥した。凍結乾燥標品は秤量後 1 M 酢酸に溶解し、陽イオン交換樹脂 (SP-Sephadex、ファルマシア社、 $3 \times 28 \text{ cm}$) の充填されたオープンカラムに吸着させ、素通り画分 (SP-I)、 2 M ピリジン ($\text{pH } 8.0$) で溶出される溶出画分 (SP-II)、 2 M ピリジン-酢酸 ($\text{pH } 5.0$) で溶出される画分 (SP-II I) に分画し、SP-III 強イオン性画分を得た。この画分を凍結乾燥した後 1 M 酢酸に溶解し、ゲル濾過 (SephadexG-50、ファルマシア社、 $7.5 \times 145 \text{ cm}$ 、 1 M 酢酸、流速 100 ml/h) で分子量に応じてフラクションに分画し、分子量 1 kDa から 5 kDa に相当する部分を集めた。これを再びゲル濾過 (SephadexG-25、ファルマシア社、 $7.5 \times 145 \text{ cm}$ 、 1 M 酢酸、流速 100 ml/h) で、分子量に応じた画分に分離し、分子量 2 kDa から 4 kDa に相当する部分を集め、凍結乾燥した。

凍結乾燥標品をイオン交換クロマトグラフィー (CM52, Whatman 社、 $2.4 \times 45 \text{ cm}$ 、

A液：10 mM ギ酸アンモニウム (pH 6.5) : アセトニトリル = 9 : 1、B液：1 M ギ酸アンモニウム (pH 6.5) : アセトニトリル = 9 : 1、流速 35 ml/h) を用いて、10 mM から 0.5 M までギ酸アンモニウムによる濃度勾配溶出を行った。

ここで各画分の 1/1000 量を凍結乾燥し、凍結乾燥標品をダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM、0.05% 牛血清アルブミンを含む) に溶解した培地でブタ腎臓由来の上皮細胞 LLC-PK₁ を刺激して 37℃ 1 時間インキュベーションし、培地に分泌される cAMP 量をラジオイムノアッセイにより定量した。

方法は未知量の cAMP を含む培地及び既知濃度の cAMP を含む培地 100 μ l に、4% になるように無水コハク酸を溶解したジオキサンートリエチルアミン混合液 (ジオキサン : トリエチルアミン = 4 : 1) を等量加え、30 分間室温で放置して cAMP をサクシニル化し、遠心エバポレーターで乾固した後、1 ml の緩衝液 (50 mM 酢酸ナトリウム (pH 6.2)、1 mM EDTA、0.025% アジ化ナトリウム、0.5% 血清アルブミン、0.01% Triton X-100) に溶解し、その内 100 μ l ずつを試験管に取り分け、50 μ l ずつ放射性標識したサクシニル化 cAMP 及び抗体を加え、4℃ で 48 時間放置した。次に 100 μ l の 1% γ -グロブリン及び 500 μ l の 25% ポリエチレングリコールを添加してよく混和し、遠心分離を行って沈殿の放射活性をガンマカウンターを用いて測定し、既知濃度の cAMP により作成した標準曲線の放射活性と比較することで cAMP 量を定量した。

CRSP-Gly による cAMP 産生の上昇はギ酸アンモニウム (pH 6.5) 約 0.27 M で溶出される画分に観察された。さらに陽イオン交換 HPLC (TSK-gel CM-2SW、東ソー、7.8x300mm、A液：10 mM ギ酸アンモニウム (pH 3.8) : アセトニトリル = 9 : 1、B液：1 M ギ酸アンモニウム (pH 3.8) : アセトニトリル = 9 : 1、流速 2 ml/min) でギ酸アンモニウムの濃度勾配溶出を行った。再びそれぞれの画分の 1/1000 量を取り、活性を測定し、活性の観察された画分 (ギ酸アンモニウム (pH 3.8) 約 0.36 M で溶出) を、さらに逆相 HPLC (C₁₈: 218TP54, Vydac 社、4.6x250mm、A液：水 : アセトニトリル : 10% トリフルオロ酢酸 = 90 : 10 : 1、B液：水 : アセトニ

トリル：10%トリフルオロ酢酸＝40：60：1、流速1ml/min)でアセトニトリルによる濃度勾配溶出を行い、活性を持つ画分(アセトニトリル約32%で溶出)を得た。これを再び逆相HPLC(diphenyl 219TP5215, Vydac社、2.1x150mm、A液：水：アセトニトリル：10%トリフルオロ酢酸＝90：10：1、B液：水：アセトニトリル：10%トリフルオロ酢酸＝40：60：1、流速0.2ml/min)にて分離し、(アセトニトリル約29%で溶出)最終的な精製標品を得た。

実際の精製行程において約50 pmolのペプチドが得られた。このペプチドの分子量は4157 Daで理論上の等電点は11.41と算出された。また上述の通りVydac社のC18カラム(4.6x250mm, 218TP54)で0.1% TFA存在下、アセトニトリル濃度約32%で溶出される程度の疎水性を持っていた。

実施例12 (CRSP-GlyのcAMP産生促進作用)

ブタカルシトニン受容体(CTR)を哺乳類発現ベクターpcDNA3.1に導入し、アカゲザル腎細胞(COS-7)に発現させてCRSP又は、CRSP-Gly刺激によるcAMP産生量をラジオイムノアッセイにより測定した。

結果を第15図に示す。

実施例13 (イヌ・ウシCRSPの遺伝子クローニング)

RNAはイヌ及びウシの甲状腺より、酸性グアニジンフェノールクロロホルム抽出法により抽出した。mRNAの精製は宝酒造Oligotex-dT30 mRNA精製キットを用いて行った。相補的DNAλファージライブラリーはイヌ及びウシの甲状腺mRNA(3 µg)よりファルマシア社Time saver cDNA作成キット及びStratagene社 λZAPIIを用いて作成した。プローブはブタカルシトニン受容体刺激ペプチドの全長約700 bpを用いた。スクリーニングの方法は大腸菌をλファージ(約30万個の独立したクローンを持つ)に感染させてLB培地を含む0.7%アガロースと混合し、LB培地を含む1.5%寒天培地を敷いた培養皿に播き、37℃で8時間ほど培養した。冷蔵庫で2時間ほど冷却した後、形成したプラークをナイロンフィルターに転写し、アルカリ変性(0.5 M水酸化ナ

トリウム + 1.5 M 塩化ナトリウム溶液で 2 分間、0.5 M トリス-塩酸塩 (pH 7.5) + 1.5 M 塩化ナトリウム溶液で 2 分間、45 mM クエン酸ナトリウム (pH 7.0) + 450 mM 塩化ナトリウムで 5 分間処理を行う) 後、フィルターを 80℃ で 2 時間処理した。次にフィルターをプレハイブリダイゼーション液 (20% ホルムアミド、0.09 M クエン酸ナトリウム (pH 7.0)、0.9 M 塩化ナトリウム、0.5% 牛血清アルブミン、0.5% フィコール、0.5% ポリビニルピロリドン、0.5% ラウリル硫酸ナトリウム) に 37℃ で 2 時間浸し、そこに ^{32}P で標識したプローブを加え、42℃ で 1.6 時間ハイブリダイゼーションを行った。フィルターは洗浄液で洗浄 (30 mM クエン酸ナトリウム (pH 7.0)、300 mM 塩化ナトリウム、0.1% ラウリル硫酸ナトリウム溶液、室温 5 分間を 2 回、15 mM クエン酸ナトリウム (pH 7.0)、150 mM 塩化ナトリウム、0.1% ラウリル硫酸ナトリウム溶液、60℃ 1 時間を 2 回行う) 後、X 線フィルムに感光させ、放射線により感光する部分を培養皿上のブラックと照合し、ブラックから陽性クローンを単離した。単離された陽性ファージクローンは Stratagene 社ヘルパーファージ R 4.08 を用いて DNA シーケンスに適したベクターであるプラスミド p Bluescript に変換し、塩基配列はサンガー法により決定した。

決定されたウシ CRSP をコードする cDNA の塩基配列を後記配列表の配列番号 7 に示し、そのコードするウシ CRSP の前駆体ペプチドのアミノ酸配列を配列番号 8 に示す。また、ウシ CRSP のアミノ酸配列を配列番号 6 に示す。

決定されたイヌ CRSP をコードする cDNA の塩基配列を後記配列表の配列番号 10 に示し、そのコードするイヌ CRSP の前駆体ペプチドのアミノ酸配列を配列番号 11 に示す。また、イヌ CRSP のアミノ酸配列を配列番号 9 に示す。

実施例 14 (ウシ CRSP 又はイヌ CRSP 刺激による cAMP 産生量の定量)

LLC-PK₁ 細胞を栄養培地 (10% 牛胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)) 中で培養した。2 日後、細胞を 0.05% 牛血清アルブミンを含む DMEM で 2 回洗浄し、培養皿中の培地を 0.5 mM の 3-イソブチル-1-メチルキサンチン (3-isobutyl-1-methylxanthine) 及び 0.05% 牛血清

アルブミンを含むDMEM (DMEM/BSA/IBMX) に置き換えて37℃で30分間インキュベーションした。インキュベーション後、培地を0M及び $10^{-12} \sim 10^{-6} \text{M}$ になるようCRSPを溶解したDMEM/BSA/IBMXに置換し、37℃で10分間インキュベーションした。インキュベーション後、培養皿中の培地を除き、そこにエタノールを加え、細胞を破碎するために培養皿を冷蔵庫で一回凍結させた。次にエタノールを試験管に移し、遠心エバポレーターを用いて標品を乾固させた。乾固した標品はDMEMに溶解し、 $100 \mu\text{l}$ ずつ取り分け、4%になるように無水コハク酸を溶解したジオキサントリエチルアミン混合液 (ジオキサン: トリエチルアミン=4:1) を等量加え、30分間室温で放置してcAMPをサクシニル化させた。再び遠心エバポレーターで乾固した後、1mlの緩衝液 (50mM酢酸ナトリウム (pH 6.2)、1mM EDTA、0.025%アジ化ナトリウム、0.5%血清アルブミン、0.01% Triton X-100) に溶解し、その内 $100 \mu\text{l}$ ずつを試験管に取り分け、 $50 \mu\text{l}$ の放射性標識したサクシニル化cAMP及び $50 \mu\text{l}$ の抗体を加え、4℃で48時間放置した。次に $100 \mu\text{l}$ の1% γ -グロブリン及び $500 \mu\text{l}$ の25%ポリエチレングリコールを添加してよく混和し、遠心分離を行って沈殿の放射活性をガンマカウンターを用いて測定し、既知濃度のcAMPにより作成した標準曲線の放射活性と比較することでcAMP量を定量した。

結果を第16図に示す。

実施例15 (CRSP-2及びCRSP-3/CT-2前駆体遺伝子のクローニング)

ブタ遺伝子ライブラリーはクローンテック社から購入した。プローブはブタカルシトニン受容体刺激ペプチドの前駆体cDNA全長約700bpを用いた。スクリーニングの方法は大腸菌をブタ遺伝子が挿入された λ ファージ (約100万個の独立したクローンを持ち、その内約30万個について行った) に感染させてLB培地を含む0.7%アガロースと混合し、LB培地を含む1.5%寒天培地を敷いた培養皿に播き、37℃で8時間ほど培養した。冷蔵庫で2時間ほど冷却した後、形成したプラークをナイロンフィルターに転写し、アルカリ変性 (0.

5 M水酸化ナトリウム + 1. 5 M塩化ナトリウム溶液で2分間、0. 5 Mトリス-塩酸塩 (pH 7. 5) + 1. 5 M塩化ナトリウム溶液で2分間、4. 5 mMクエン酸ナトリウム (pH 7. 0) + 450 mM塩化ナトリウムで5分間処理を行う) 後、フィルターを80℃で2時間処理した。次にフィルターをプレハイブリダイゼーション液 (20%ホルムアミド、0. 09 Mクエン酸ナトリウム (pH 7. 0)、0. 9 M塩化ナトリウム、0. 5%牛血清アルブミン、0. 5%フィコール、0. 5%ポリビニルピロリドン、0. 5%ラウリル硫酸ナトリウム) に37℃で2時間浸し、そこに³²Pで標識したプローブを加え、42℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。フィルターは洗浄液で洗浄 (30 mMクエン酸ナトリウム (pH 7. 0)、300 mM塩化ナトリウム、0. 1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、室温5分間を2回、7. 5 mMクエン酸ナトリウム (pH 7. 0)、75 mM塩化ナトリウム、0. 1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、55℃、1時間を2回行った) 後、X線フィルムに感光させ、放射線により感光する部分を培養皿上のブランクと照合し、ブランクから陽性クローンを単離した。単離された陽性入ファージクローンは種々の制限酵素を用いて切断し、サザンブロットイング法により解析を行って制限酵素地図を作製した後、適当な制限酵素を用いて陽性クローンを含むDNAをpBlue-scriptにサブクローニングした。塩基配列はサンガー法により決定した。スクリーニングの結果、25個の陽性クローンを得ることができた。制限酵素による解析及び塩基配列決定の結果、10個のクローンはCRSPの遺伝子をコードしていることが判明した (第17図)。残りの15個のクローンの内、9個は別の遺伝子を (第18図及び第19図)、6個はさらに別の遺伝子をコードしていることが判った。9個の遺伝子はCRSPと相同性を持つ配列を有していた。この遺伝子をCRSP-2と名付けた。また別の6個の遺伝子はCRSPとCTに相同性を有する配列を持っていた。これら遺伝子をCRSP-3及びCT-2と名付けた。第17図～第19図において下線部がエクソンを示す。

CRSP遺伝子の塩基配列を後記配列表の配列番号5に記載する。また、CRSP-2遺伝子を配列表の配列番号15に記載する。CRSP-3遺伝子とCT-2遺伝子を含むDNA断片の塩基配列を配列表の配列番号23に記載する。

CRSPやCT/CGRPの遺伝子配列を参考に推定したcDNA配列は第20図～第22図に示す(第20図:CRSP-2、第21図:CRSP-3、第22図:CT-2)。第20図～第22図において、実線で囲まれた部分が成熟ペプチドで、灰色がアミドに変換されると推定されるグリシン、斜体部がシグナルペプチド、第22図における成熟体のN末端側にあるグルタミンはピログルタミン酸に変換されると推定される。また各CRSPとCGRPやAM、CT-2とCTのアミノ酸の比較を行ったものが第23図である。

CRSP-2のcDNAの塩基配列を後記配列表の配列番号13に、CRSP-3のcDNAを配列番号17に、CT-2のcDNAを配列番号21に記載する。

CRSP-2、CRSP-3とCT-2の成熟体アミノ酸配列は以下であると予想される。

CRSP-2 :	Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Ser-Cys-Val-Thr-His	10
	Lys-Met-Thr-Gly-Trp-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly	20
	Ser-Val-Ala-Lys-Asn-Asn-Phe-Met-Pro-Thr	30
	Asn-Val-Asp-Ser-Lys-Ile-Leu-NH ₂	37
CRSP-3 :	Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Ile-Cys-Val-Thr-His	10
	Lys-Met-Ala-Gly-Trp-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly	20
	Ser-Val-Val-Lys-Asn-Asn-Phe-Met-Pro-Ile	30
	Asn-Met-Gly-Ser-Lys-Val-Leu-NH ₂	37
CT-2 :	pGlu-Cys-Asn-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu	10
	Gly-Thr-Tyr-Thr-Trp-Asp-Val-Asn-Lys-Phe	20
	Tyr-Ala-Phe-Pro-Leu-Thr-Thr-Thr-Gly-Ile	30
	Arg-Val-Ser-NH ₂	33

CRSP-2のアミノ酸配列を後記配列表の配列番号12に、CRSP-3を配列番号16に、CT-2を配列番号19に記載する。

実施例16 (CRSP-2の前駆体cDNAクローニング)

cDNAライブラリーはCRSPのcDNAクローニングを行った時に作成し

たブタ視床下部 cDNA が挿入された λ ファージライブラリーを用いた。プローブはブタカルシトニン受容体刺激ペプチドの全長約 700 bp を用いた。スクリーニングの方法は大腸菌をブタ視床下部 cDNA が挿入された λ ファージに感染させて LB 培地を含む 0.7% アガロースと混合し、LB 培地を含む 1.5% 寒天培地を敷いた培養皿に播き、37℃ で 8 時間ほど培養した。冷蔵庫で 2 時間ほど冷却した後、形成したプラークをナイロンフィルターに転写し、アルカリ変性 (0.5 M 水酸化ナトリウム + 1.5 M 塩化ナトリウム溶液で 2 分間、0.5 M トリス-塩酸塩 (pH 7.5) + 1.5 M 塩化ナトリウム溶液で 2 分間、45 mM クエン酸ナトリウム (pH 7.0) + 450 mM 塩化ナトリウムで 5 分間処理を行う) 後、フィルターを 80℃ で 2 時間処理した。次にフィルターをプレハイブリダイゼーション液 (20% ホルムアミド、0.09 M クエン酸ナトリウム (pH 7.0)、0.9 M 塩化ナトリウム、0.5% 牛血清アルブミン、0.5% フィコール、0.5% ポリビニルピロリドン、0.5% ラウリル硫酸ナトリウム) に 37℃ で 2 時間浸し、そこに ³²P で標識したプローブを加え、42℃ で 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。フィルターは洗浄液で洗浄 (30 mM クエン酸ナトリウム (pH 7.0)、300 mM 塩化ナトリウム、0.1% ラウリル硫酸ナトリウム溶液、室温 5 分間を 2 回、15 mM クエン酸ナトリウム (pH 7.0)、150 mM 塩化ナトリウム、0.1% ラウリル硫酸ナトリウム溶液、60℃ 1 時間を 2 回行う) 後、X 線フィルムに感光させ、放射線により感光する部分を培養皿上のプラークと照合し、プラークから陽性クローンを単離した。単離された陽性 λ ファージクローンは Stratagene 社 ヘルパーファージ R408 を用いて DNA シーケンスに適したベクターであるプラスミド p Bluescript に変換し、塩基配列はサンガー法により決定した。以上の結果、13 個の陽性クローンを得ることができた。その内 6 個は全て CRSP 前駆体 cDNA のほぼ全長を含むクローンであり、また別の 6 個は全て CRSP-2 前駆体 cDNA のほぼ全長を含むクローンであった (第 20 図)。残りの 1 個は CRSP-3 の 3' 非翻訳領域をコードする短いクローンであった。

実施例 17 (CRSP-3 及び CT-2 cDNA のクローニング)

ブタ視床下部 cDNA (mRNA で 20 ng 分) を鋳型にし、プライマー (CRSP-3 : GCCCAGCTTACGTCTCCTTT 及び TCAGGTAAGTCAATGATT、CT-2 : AGCAGCTTTGATTCTGCCAC 及び ACCTCCTCTCTGATATTCCA) 及び宝酒造 Pyrobest DNA ポリメラーゼを用いて、94℃ 15 秒 - 55℃ 15 秒 - 72℃ 1 分 - 30 サイクルの PCR 法を行った。増幅された DNA はアガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色されたバンドをアガロースゲルから回収した後、Stratagene 社 pBlue-script II にサブクローニングし、サンガー法により塩基配列を決定した。

CRSP-3 のプライマーを用いて増幅された DNA の塩基配列の解析を行った結果、CRSP-3 をコードしている事が判明した (第 5 図)。一方 CT-2 のプライマーを用いた PCR では DNA の増幅が観察されなかった。

実施例 18 (RT-PCR による CRSP、CRSP-2、CRSP-3、CT-2、CT、CGRP、GAPDH の遺伝子発現量の高感度定量)

ブタの各組織の total RNA (4 µg) 及び oligo dT プライマー及び東洋紡 Revertra Ace 逆転写酵素キットを用いて鋳型 cDNA を作成し、そのうち 1/40 を RT-PCR に用いた。各遺伝子 cDNA を増幅するための PCR は東洋紡 rTaq ポリメラーゼを用いて 94℃ 15 秒 - 60℃ 15 秒 - 72℃ 1 分 - 30 サイクルで行い、プライマーは以下の配列を用いた。

CRSP : CTCTCTGAGGAGGAATCAG 及び GAGTTCAGAGTCATAGTAACC

CRSP-2 : CTCACAGAGGAGGAAGTGTC 及び TAGAGTTCAGTTCCTTGGTG

CRSP-3 : AGCAGCTTTGATTCTGCCAC 及び TGCAGTGAAAGCAACTTGAG

CT-2 : AGCAGCTTTGATTCTGCCAC 及び ACCTCCTCTCTGATATTCCA

CT : GCCACTCAGTGAGAAGGAAG 及び TGAGGCATGAGGGATGAAGC

CGRP : GCCACTCAGTGAGAAGGAAG 及び TCACCTTACATGTGTCCCCA

GAPDH : TCACTGCCACCCAGAAGACT 及び AGTGGTCGTTGAGGGCAATG

増幅された DNA は 3% アガロースゲルで電気泳動を行い、フジフィルム FLA 2000 を用いて解析した。結果として CRSP-2 及び CRSP-3 は中枢及び甲状腺、卵巣に発現が観察された。一方 CT-2 は何れの組織でもバンドが

増幅されず、発現が観察されなかった（第24図）。CT-2は第24図に示された組織以外に限局して発現しているものと考えられる。

産業上の利用可能性

本発明は、中枢神経に発現し、カルシトニン受容体に強く作用する新規かつ有用なペプチドを提供するものである。本発明のペプチドは、カルシトニン遺伝子関連ペプチドと高い相同性を有し、カルシトニンよりも強い作用を有する。また中枢神経系に多量に発現しており、新規なカルシトニン様ペプチドとして骨粗鬆症や鎮痛剤などとして極めて有用なペプチドである。

請 求 の 範 囲

1. 少なくとも次ぎのアミノ酸配列、

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-	10
Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-	20
Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-	30
Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Phe-Gly	38

又はこれらのアミノ酸配列の一部のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加したアミノ酸配列を有し、(1) 中枢神経系において発現し、(2) カルシトニン受容体に強く作用する性質、(3) 細胞の cAMP 産生能を促進させる性質を有するペプチド。

2. さらに(4) ナトリウムイオンを濃度依存的に取り込む性質、(5) カルシウムイオンの取り込みを抑制する性質、及び(6) 細胞増殖を抑制する性質を有する請求の範囲第1項に記載のペプチド。

3. ペプチドが少なくとも配列表の配列番号1、配列番号2、配列番号6、配列番号9、配列番号12、配列番号16、若しくは配列番号19で示されるアミノ酸配列、又はこれらのアミノ酸配列の一部が欠失、置換若しくは付加を受けたアミノ酸配列を有する請求の範囲第1項又は第2項に記載のペプチド。

4. 哺乳動物由来のペプチドである請求の範囲第1項～第3項のいずれかに記載のペプチド。

5. 請求の範囲第1項～第4項のいずれかに記載のペプチドをコードする遺伝子。

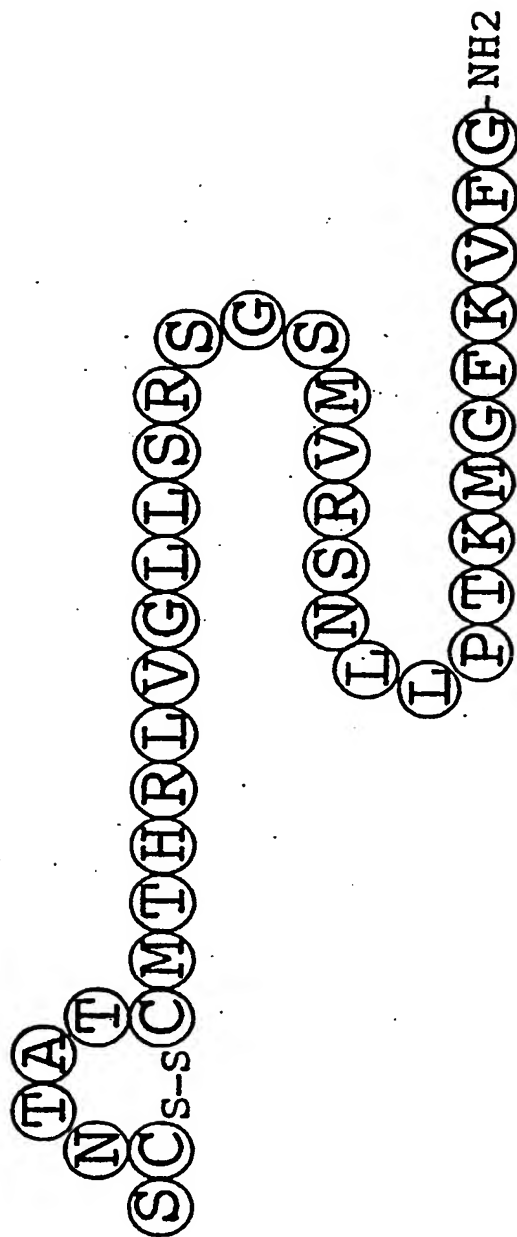
6. 遺伝子が、配列表の配列番号 3、配列番号 7、配列番号 10、配列番号 13、配列番号 17、又は配列番号 20 で示される塩基配列を有するものである請求の範囲第 5 項に記載の遺伝子。

7. 請求の範囲第 1 項～第 4 項のいずれかに記載のペプチド、及び製薬上許容される担体とからなる医薬組成物。

8. 医薬組成物が、骨粗鬆症の予防・治療剤、癌の予防・治療剤、利尿剤、食欲抑制剤、又は鎮痛剤である請求の範囲第 7 項に記載の医薬組成物。

9. 医薬組成物が、降圧剤、又は P T C A（経皮的冠動脈形成術）後の再狭窄を防ぐための薬剤である請求の範囲第 7 項に記載の医薬組成物。

第 1 図

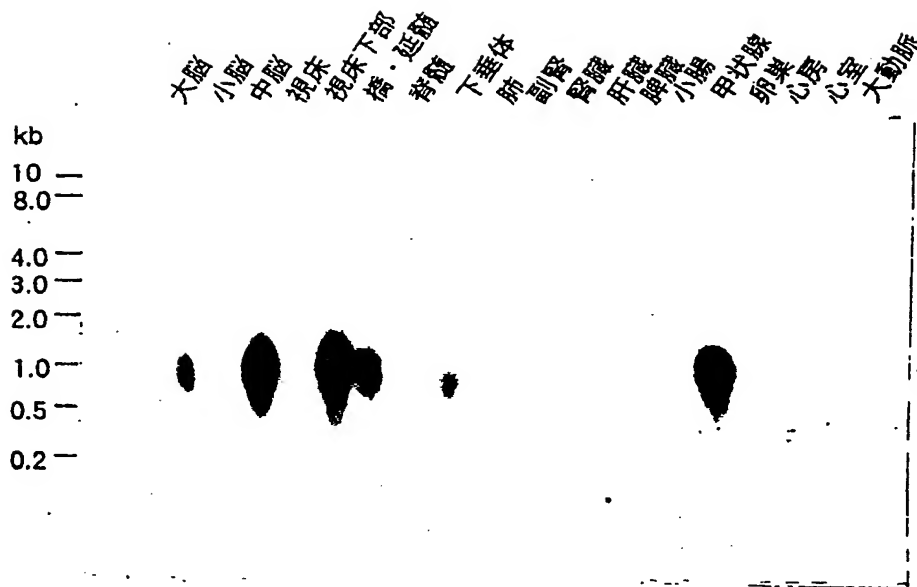


第 2 図

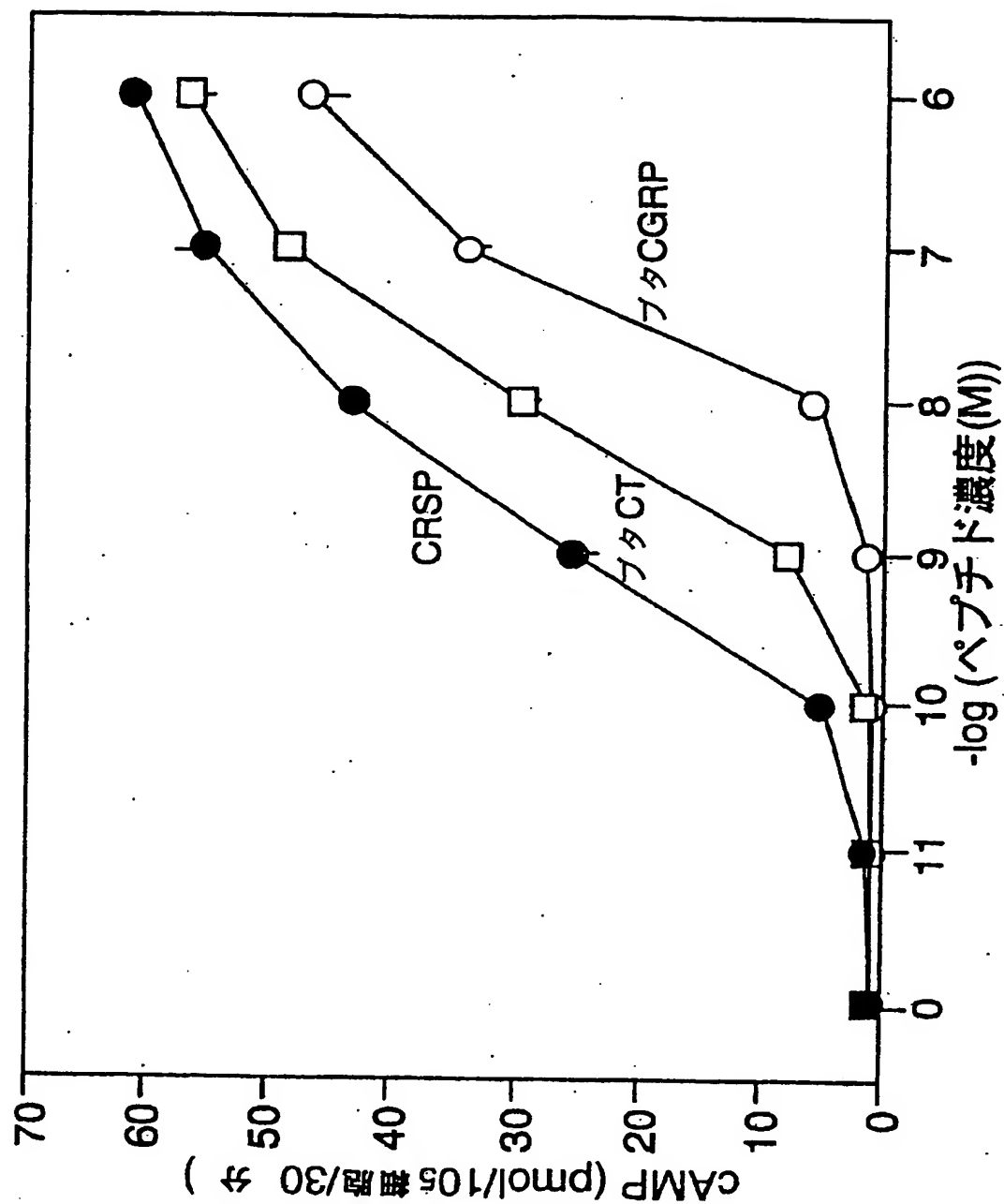
pCRSP
 pCGRP-I
 hCGRP-I
 hCGRP-II
 hAmylin
 pCT
 hAM

SCNTATCMTHRLVGLLSRSGSMVRSNLLPTKMFKVFG-NH2
 SCNTATCVTHRLAGLLSRSGMVKSNEFPTDVGSEAF-NH2
 ACDTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKNNFVPTNVGSKAF-NH2
 ACNTATCVTHRLAGLLSRSGMVKSNEFVPTNVGSKAF-NH2
 KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSSTNVGSNTY-NH2
 CSNLSCTCVLSAYWRNLNNFHRFSGMGFGPETP-NH2
 YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDNVAPRSKISPQGY-NH2

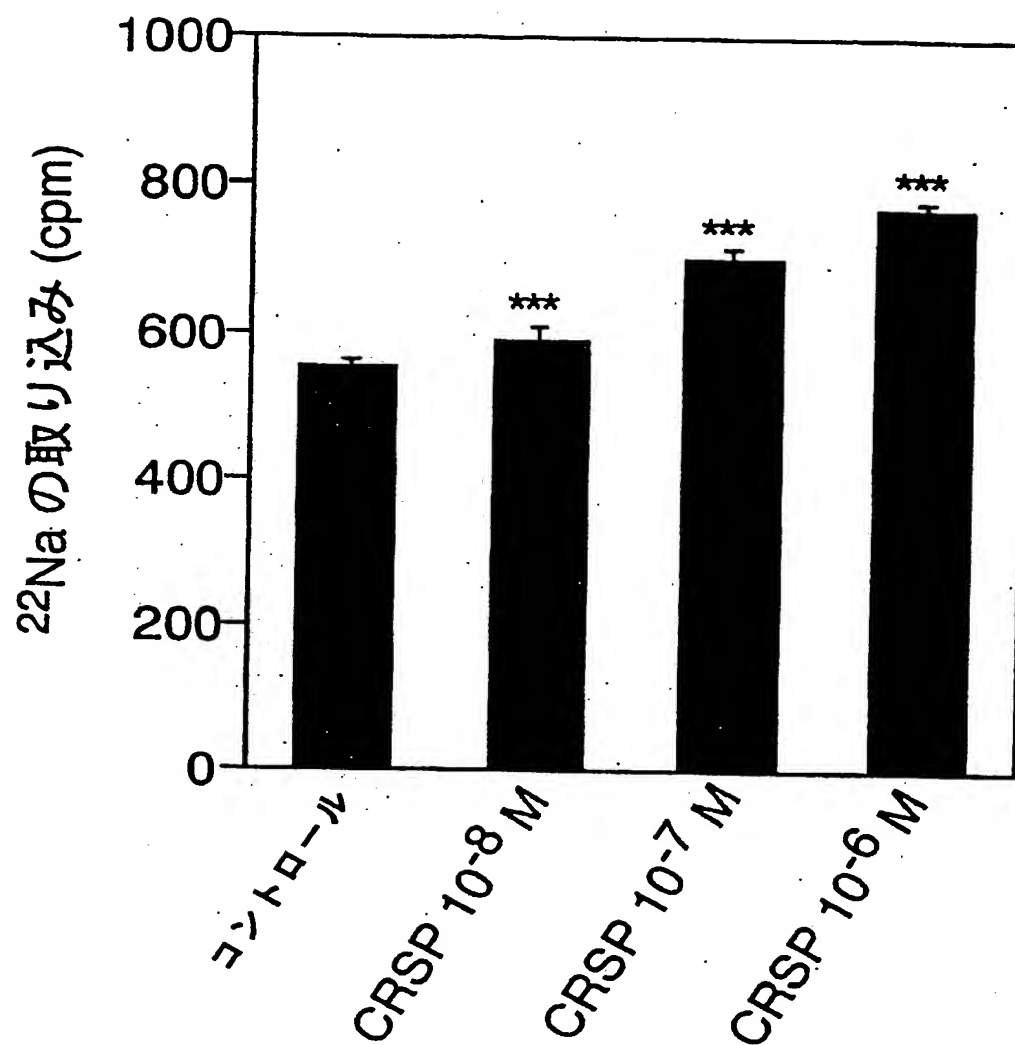
第 3 図



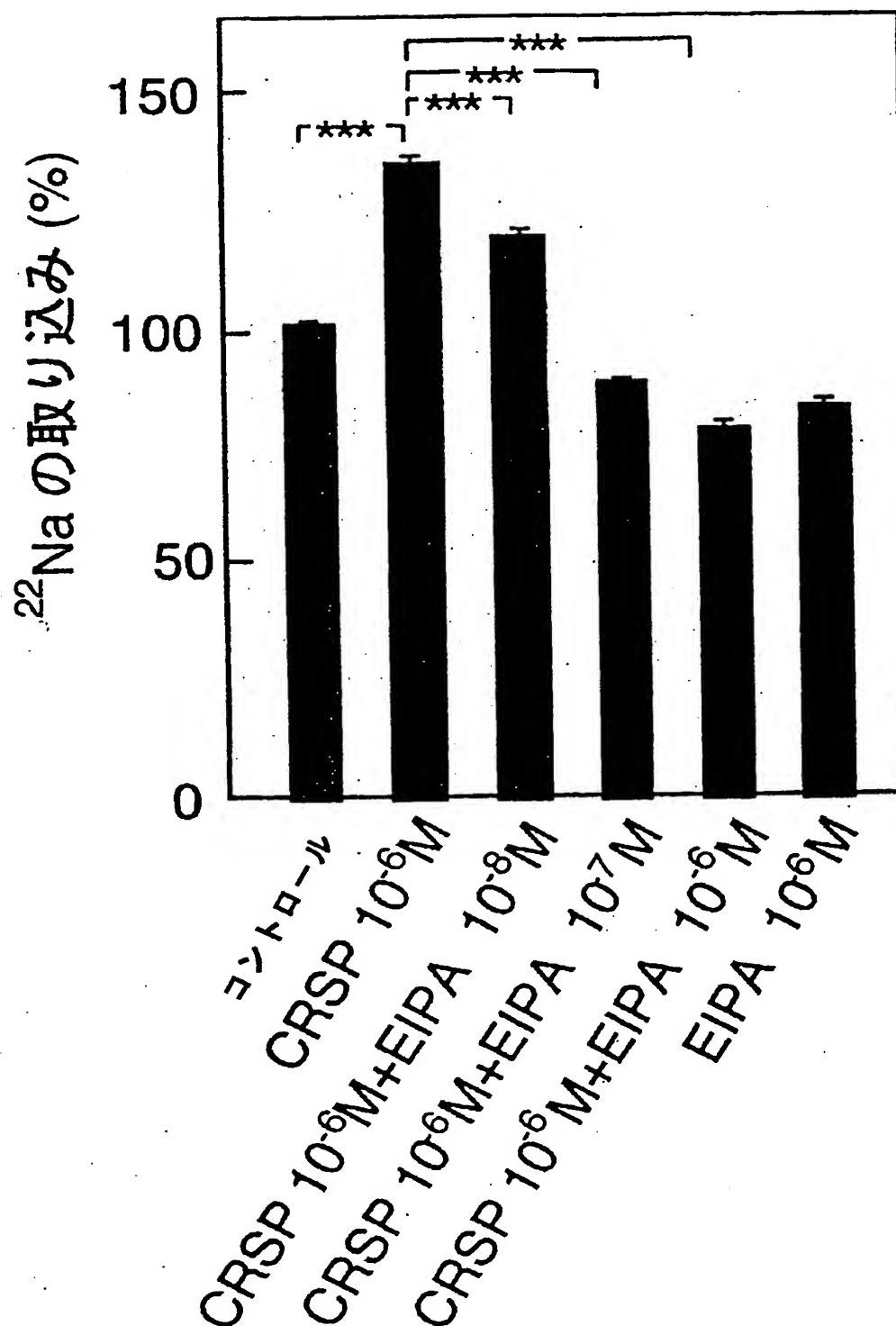
第 4 図



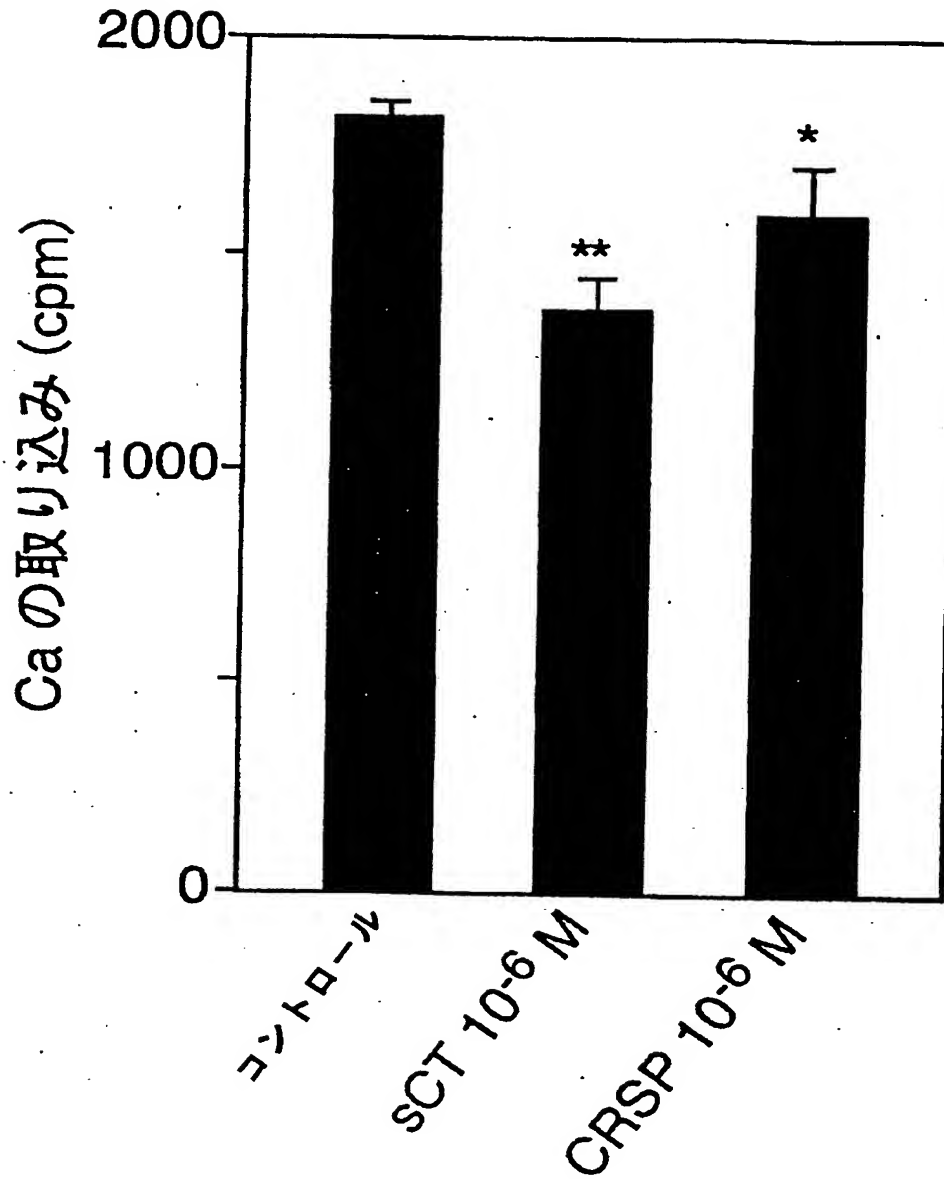
第 5 図



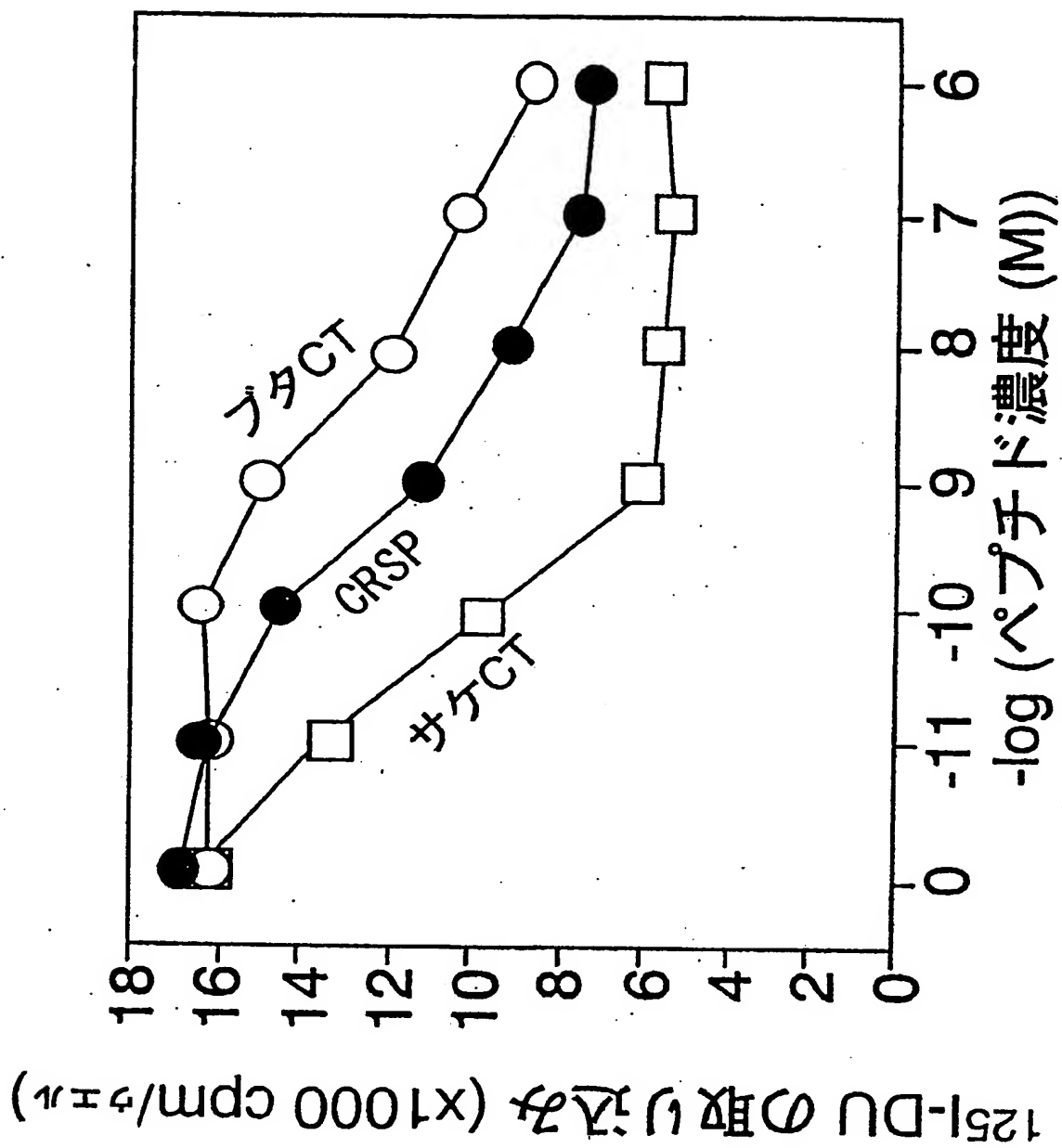
第 6 図



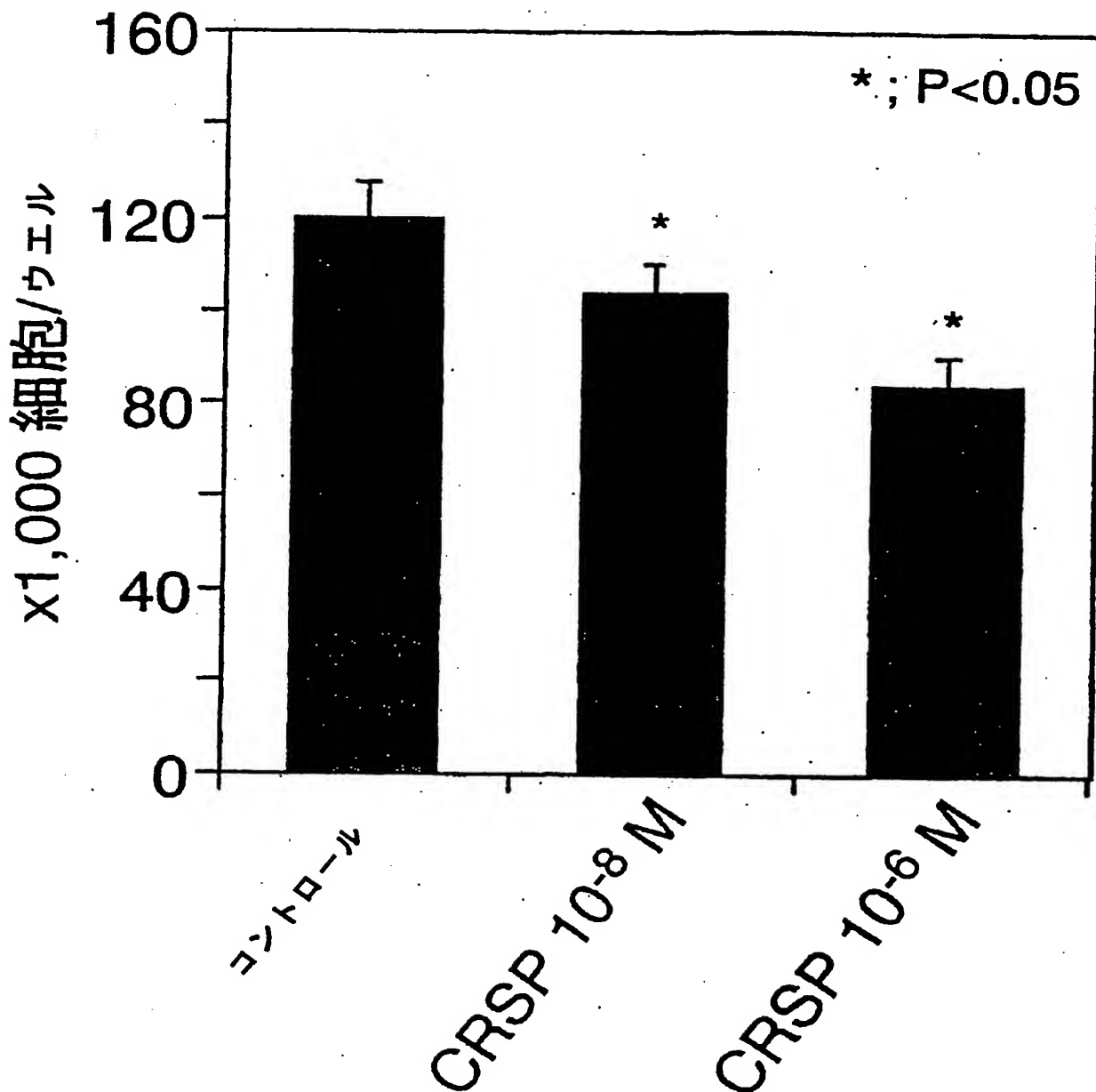
第 7 図



第 8 図

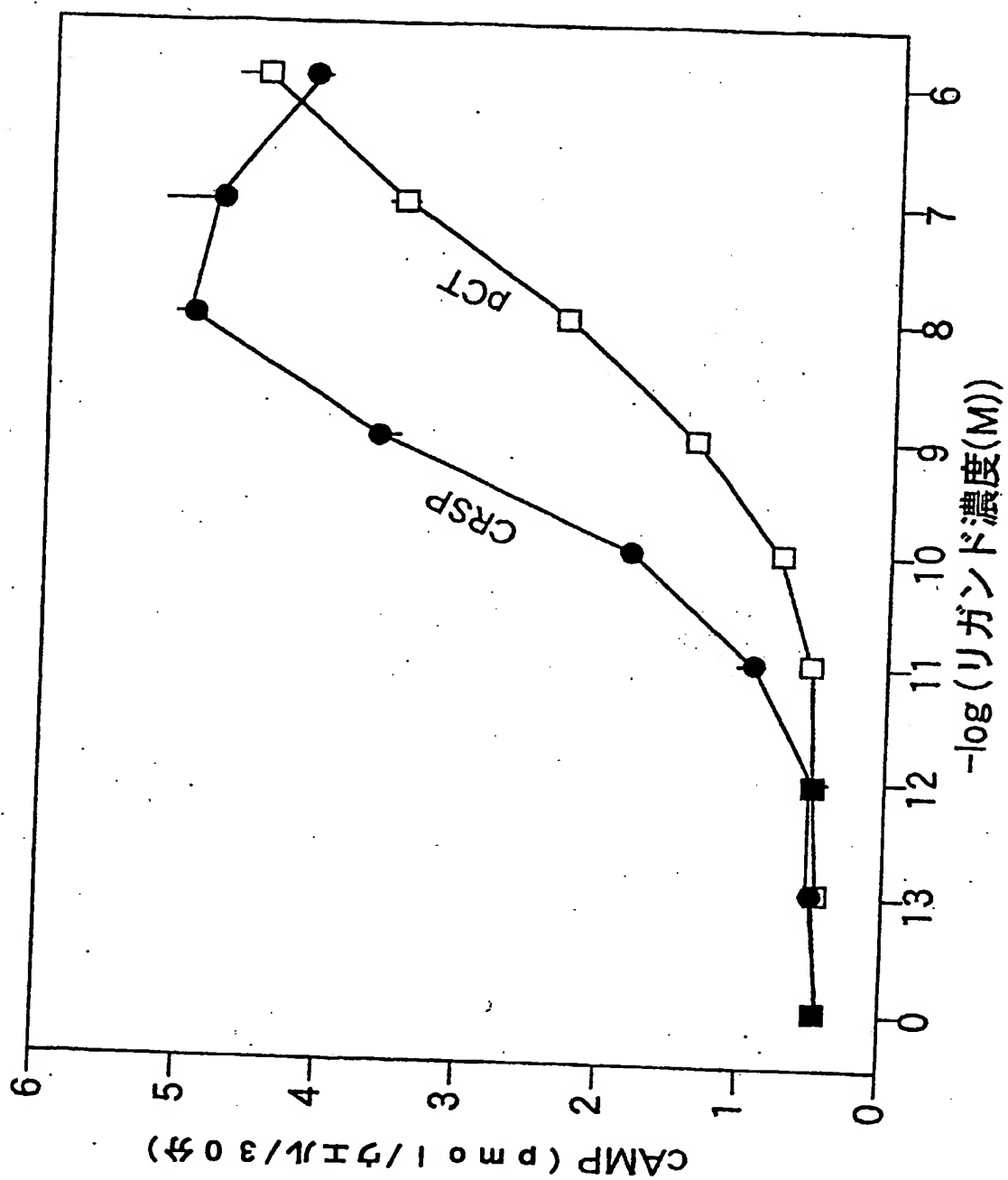


第 9 図

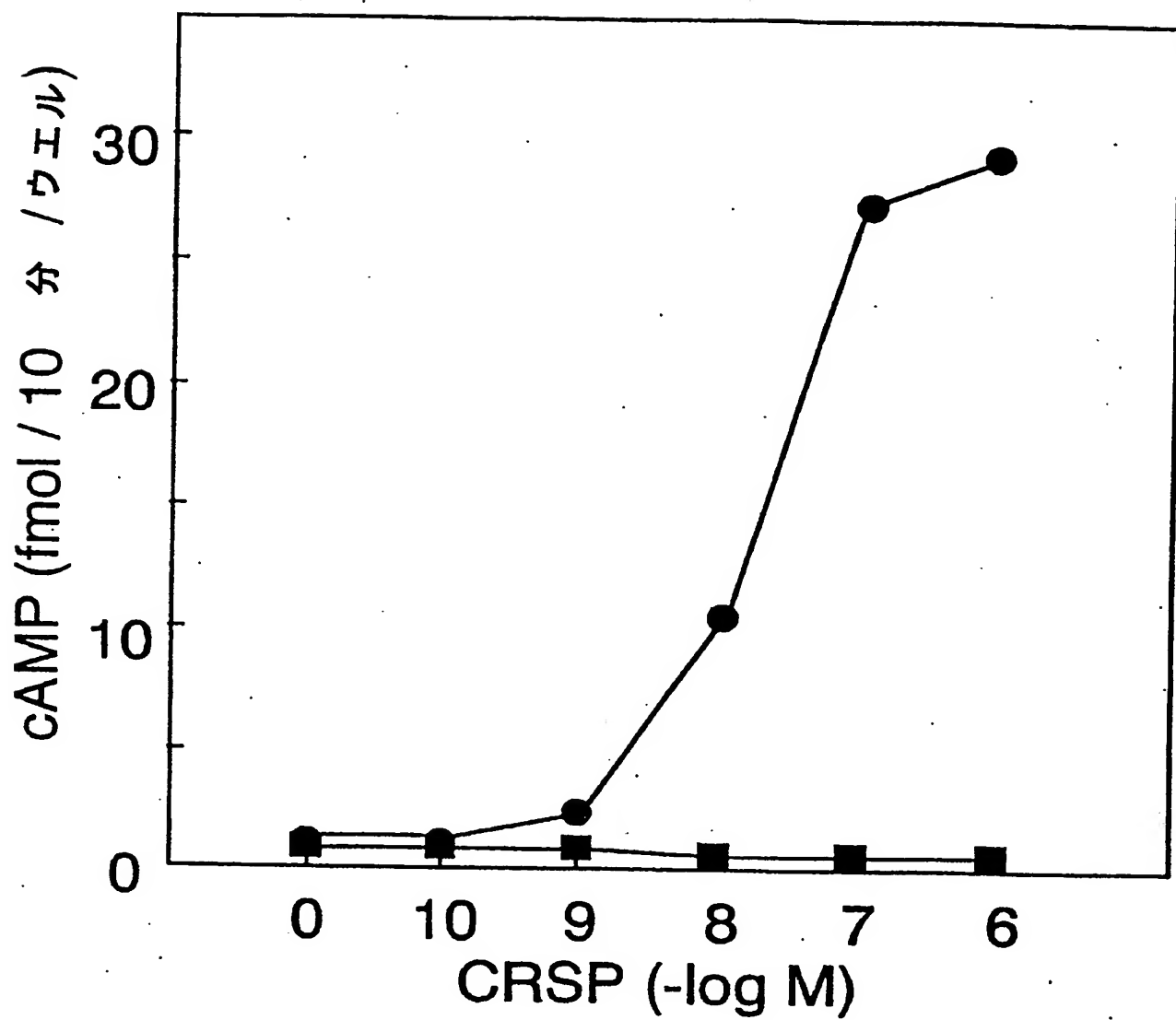


10/516700

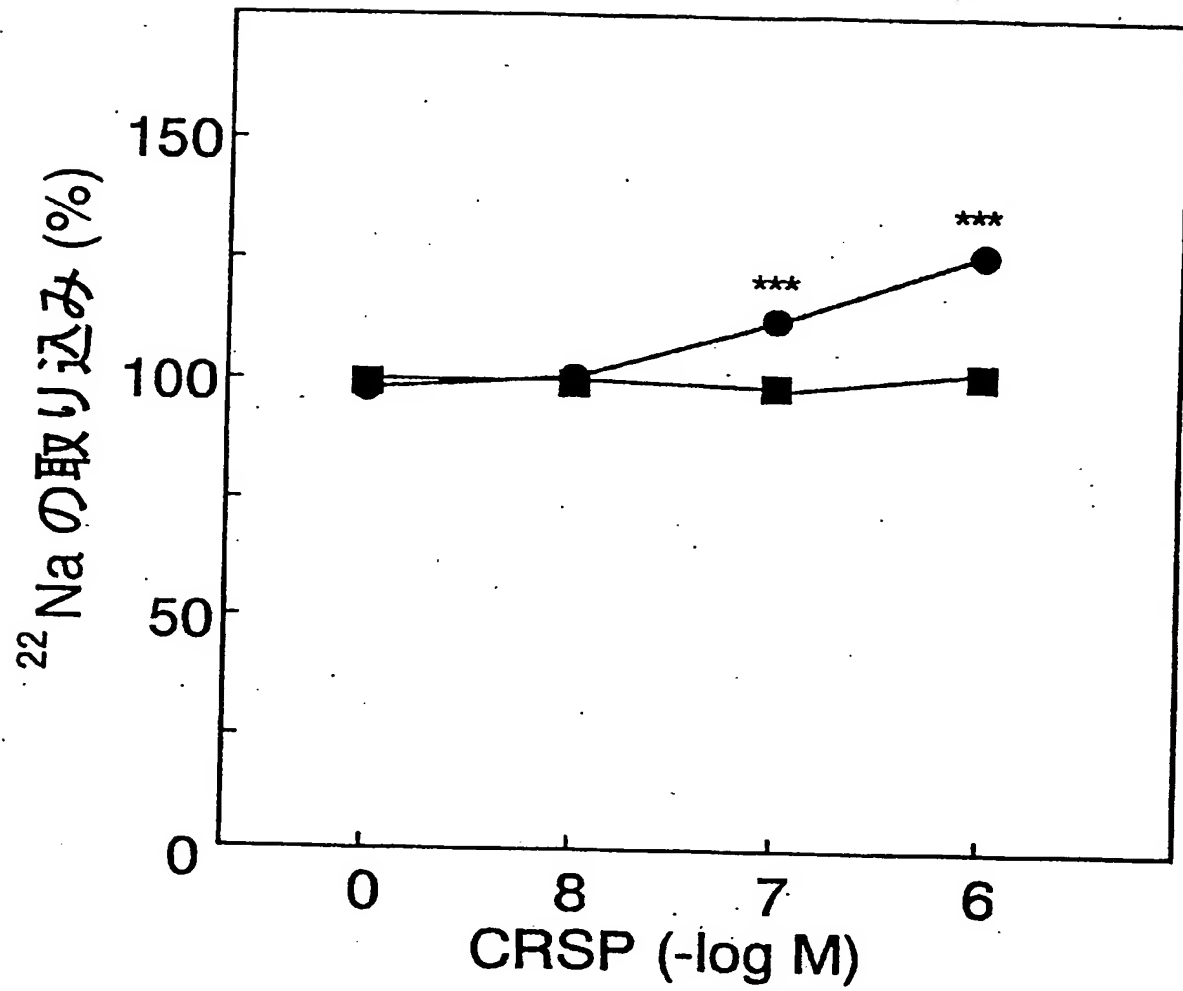
第 10 図



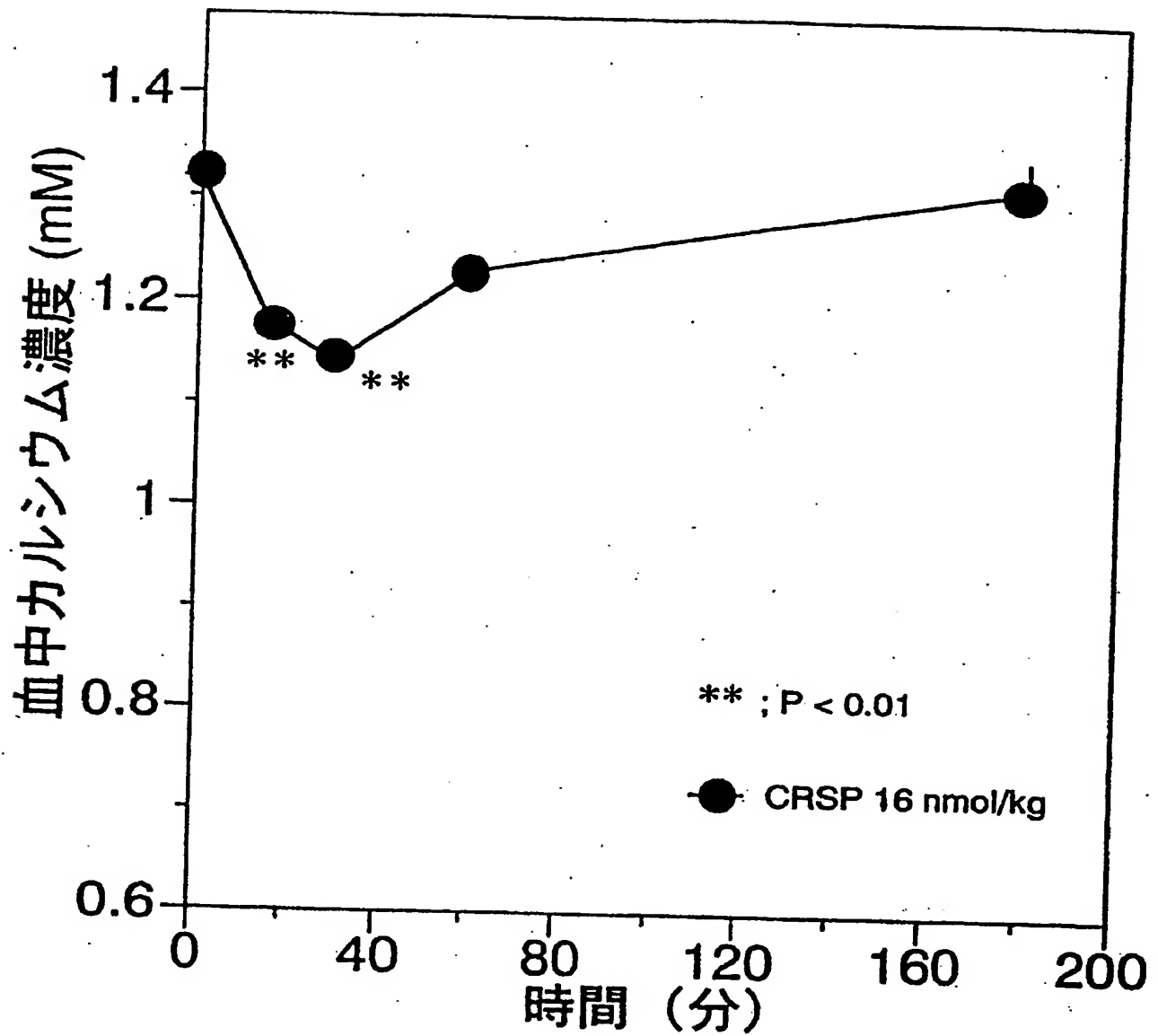
第 11 図



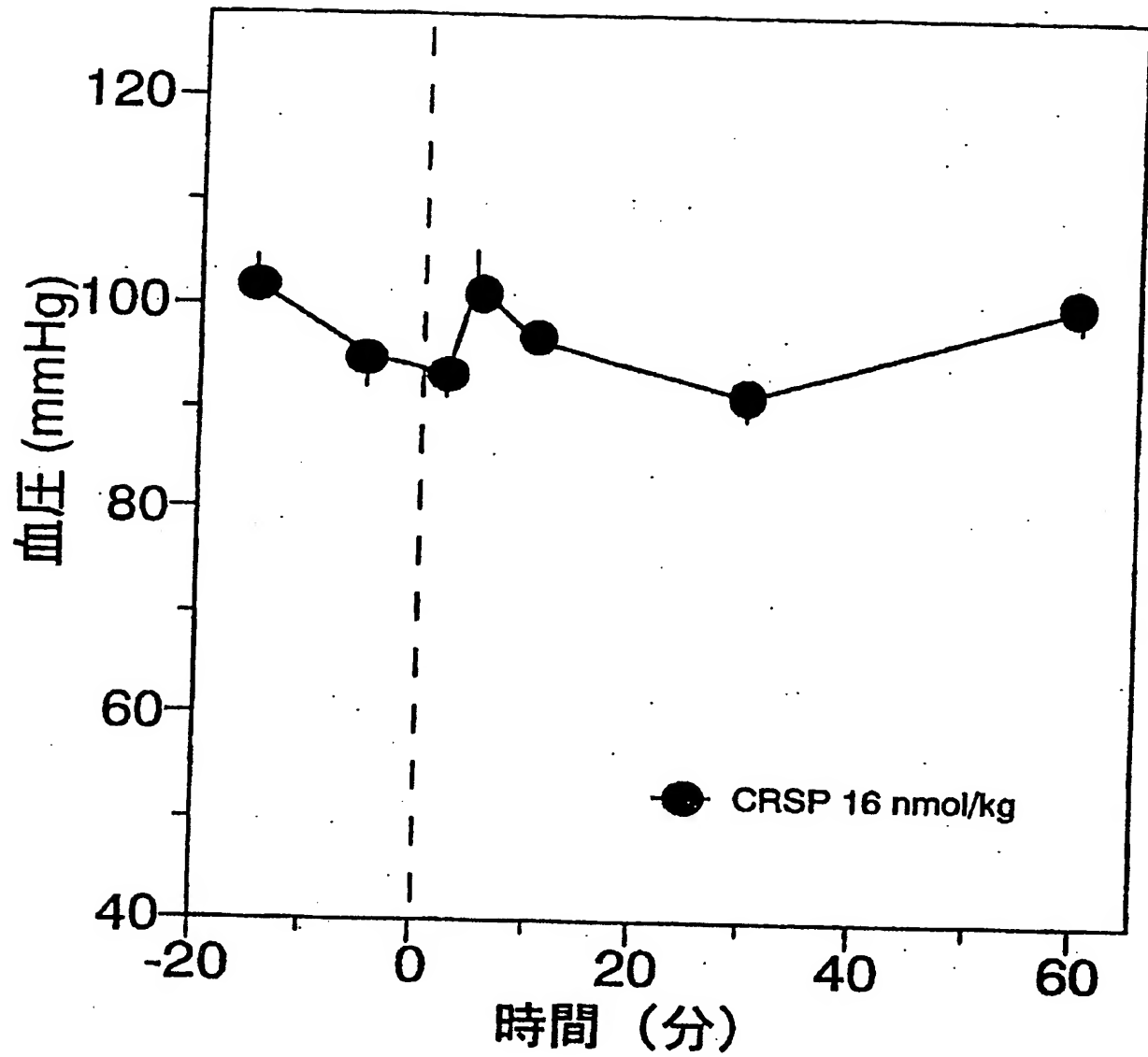
第 12 図



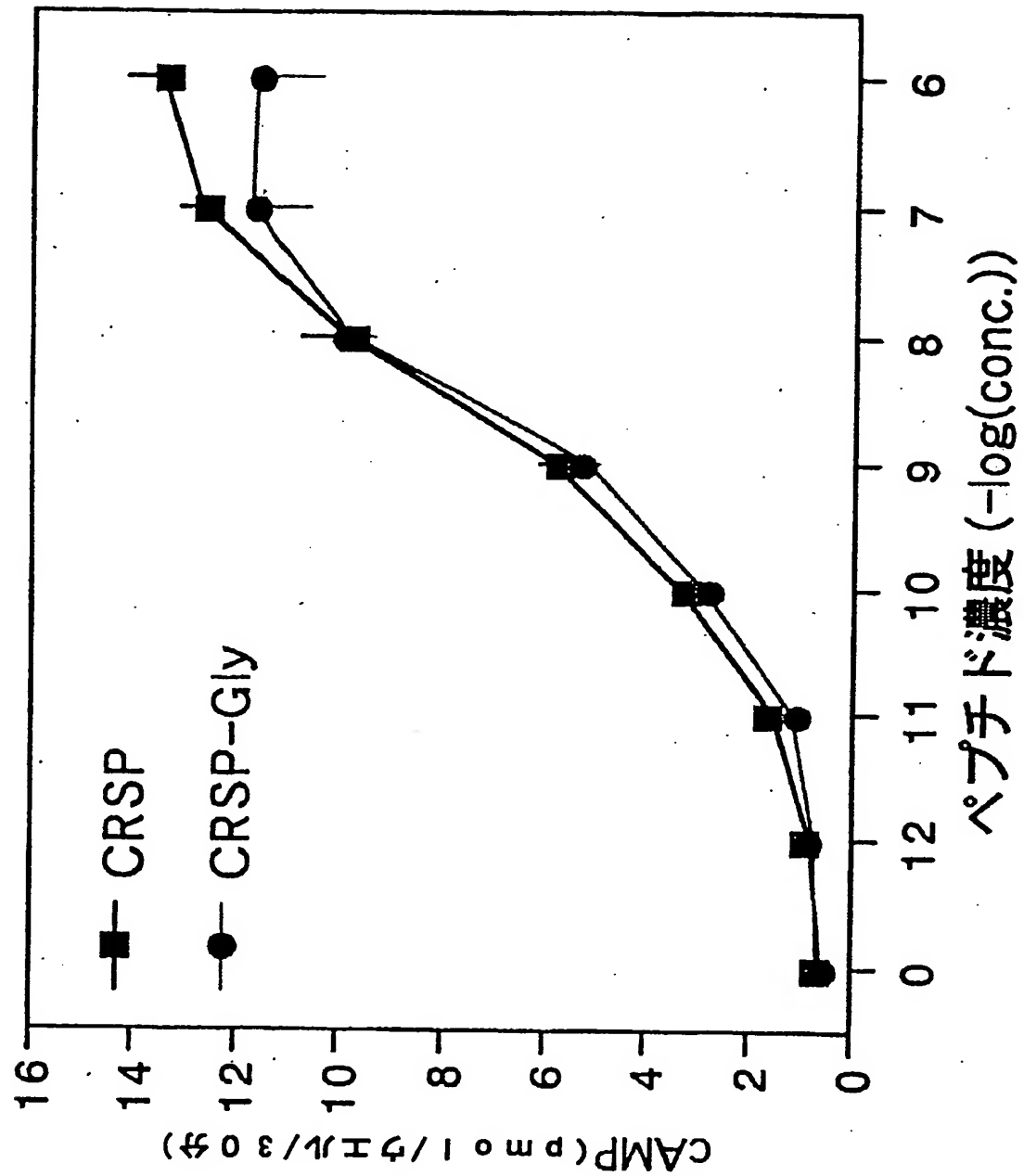
第 13 図



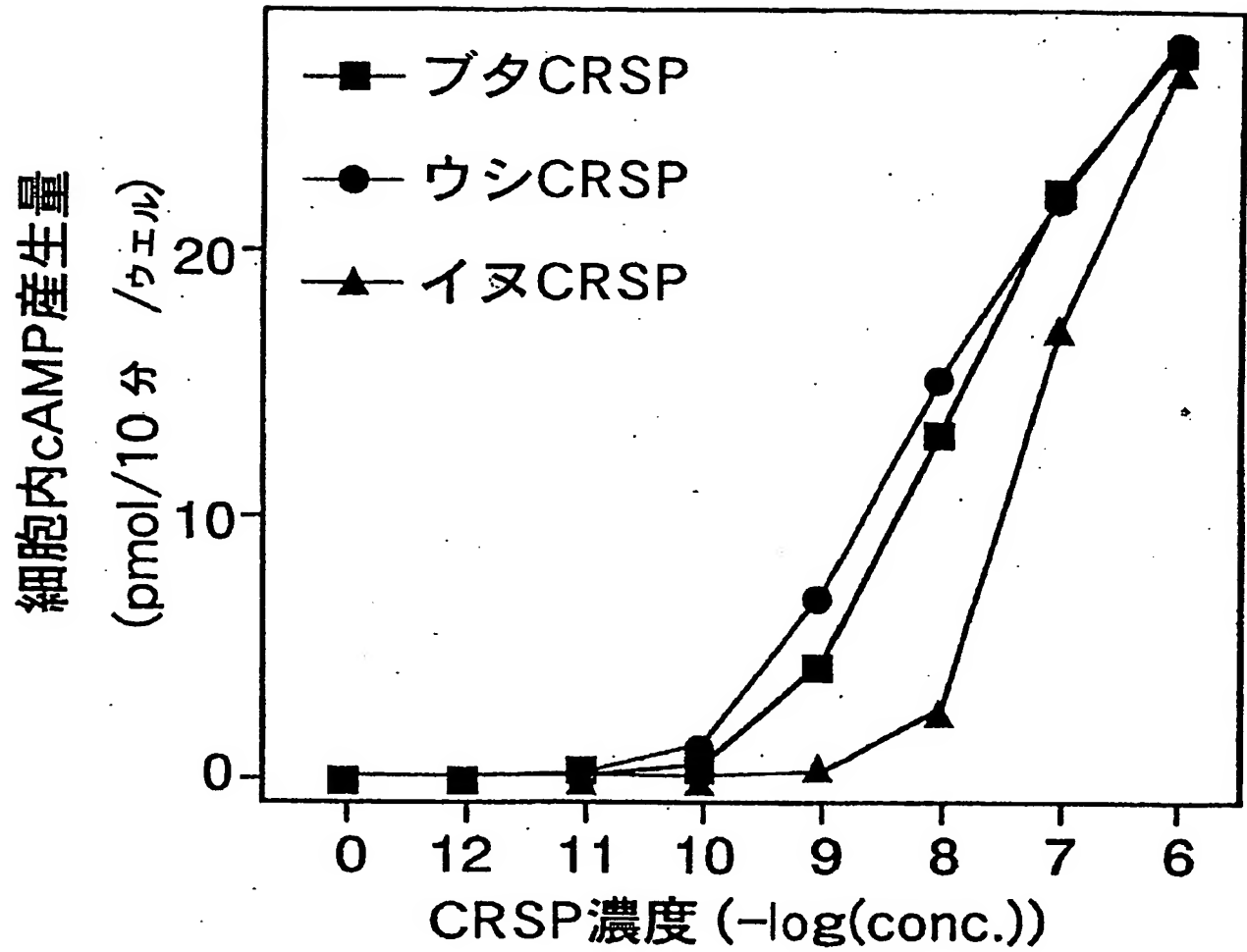
第 14 図



第 15 図



第 16 図



第 17 図

CTCGAGGATCCTGCCTCTTGTTTTCCACAAATCCTGCCTTCCTGTGCTTGATTCCAGCTG	60
CCTGAATCAGACCCCCTGCTTGGGCACAGAATCATCAACCTGCTGCGCATTAACTCCCA	120
AACCGCACTTGGACATGGTAGTCTTAGGGGACCGGGGATGCCTTGTAATGCTGGACTCTG	180
CTCTACAAAGATCACATAGCTGGGGATGGAGAGGGATGTGAGCCTGCGAAACCGAACAGG	240
TAAAGTTTACCATGACGTCAAACCTGTCCTTAAATTCCCTGCTCACTTTGCGTGTGTTTTTC	300
GTTGGTGCCCAACCTCCCCACCCCCTCCCACCCCGCCATCAATGACCTCAATGCAA	360
ATACAAGTGGGGTGGTCCTGTGGATGCTCCAGGTTCTGGACGCAAGTAGTGACACAATC	420
CTGGGGCTCAGGATCTTTCTCTCATTTGGTTGCCTGGAGCTCTGGGACCACCCAGATTC	480
AGAGCGGCGGGAATAAGAGCAGCTGCTGGTGCGGGGAAGGGTTAGAGGCACCTACCCACCT	540
CAAGTGTCTCTGCCGCTTCTTCCACAGTGCCATCGCCTGACGCCAACGCTGCTGCCTCTG	600
CTCCCTCCTCTGCTCCAGTCCACCTGGTTCTCTGCTGCCCGGTAAGCCCGGAGATTCTCTG	660
TAAGCTGTGGTTCTGTTTTCTCTCTCCCTCTCCCTTCCCTCTCTCTCCATTGGATTTT	720
CTTAGCTGATCTCTTTTCCCGTCTCAAAGTTCTGTCCACTTCTCTCTGGGTCTCTTCAT	780
CCTGTAATATGCCCTTACTGCGCAATTCATTCTAGGCTCCTTTACAGGTAACCTCTGGATG	840
GTCTCAGTTCGGGGATTCCCTGCTCTACTCTTCTGAGCTGAGCTGGGCTCCAGTCTTGT	900
CCCCGCAGCAGACGTGCTTAGGTCCGTGTTGGGATTTTGGAGCTCTCCAGGCACTTCAGG	960
GAGAGGAGGATGCAGGAATAGCTTTGAGCAGAAGAACTTTTCATGGATCCCATCTCCTCT	1020
TACCTACAAGGATCGCTGGAAATGGGGTCGGGACCTGGGACAGTGCAAATGGGTGGCAAA	1080
TAGGTGCAATGACTGAGGGGAAAGTAGCTATTAAACGCAAGCCCCAGTTGAAGGTTCTGG	1140
GAACTCCCCCTCCCGCACCGCCACCCCATTTAATCTTGGGTCCCAATTTAAGGCTGTACC	1200
AGCTTGTTTCTTACAGGGTGCTCTTTGCCAGAGTATGGAGCAGCTGGACAGTAAATTTG	1260
GTTCTTCAGTTTCTCAGGGATTCCAACCTGCAGAGATATGTCCTCCCAACTCCCCTTCCCC	1320
CCAGCCAGGTATAAGCAAAAATCAGGCATCAGGAGAGATGCTGATGGGTTGCACTATGGG	1380
AAAAGCTGTGGTGACAGGTACTGCGAGTCTGTCTCCAGGAGTCCCGGCCAACAGGTTGA	1440
AGGTGAGAGTGTGGGTGTGCTGGGCAGGGGGCTATGGACGGAGACCTCCTCAGGAGTGT	1500
TCCTGCTAGGCTTCTTTGCTAAACCAAACATGTTGCAGGCTCACTGGATCTTCCAGCAGT	1560
CCACTTGGCTGAGGAGGAAATGATGGTGAAAGGAAAGGACACGAGCAGCCTGAAGCCAGG	1620
AAGCCAGGGAGTTGGAGGCAGAGGCAGGAGCAGAGCCAGGTCTGTGGGCTCAATGAACT	1680
TGGAAGTGTCTACAGGTGGTGACATTGTTCTTCCCTTGAGAGGGGCACCATGGGCTTCTG	1740
MetGlyPheTr	
GAAATTTCCGCCCTTCTGTTCTCAGCATCCTGGTCCTGTACCAGGCAGGCATGTTCCA	1800
pLysPheProProPheLeuValLeuSerIleLeuValLeuTyrGlnAlaGlyMetPheHi	
CACAGCACCAATGAGGTAAGACAGCCCTGCCAACAAAGCACACTCACTTGATGAGAATGTA	1860
sThrAlaProMetAr	
ATATAAACGTGTATATAAATTTATTATAAGGTGGCTCTGTAGAACAATGGATAGTGCCTT	1920
GCGCTCCTATAAGTTTATCATAAGCTTTATGTGTACACAAAGTTTGTAATAGACATAAG	1980
ATATACAGTACTCATGATTGTAAATTTTATATAACTTATCAAACCTCACAGCATGCTTTT	2040
TTGTTTTTCATCAAATATTTGTACCTTTTAGCACACGTATATGCTCATATTACCATAAATTA	2100
AGAAATGGATTGTATCCAATTTGCCAAATACTTTGCTAGTAAATTTGTTATTAAATCTGA	2160
TATGGGATCTACACATCTCATTTTTTCACTTCATTCAAACCTGCATTAAGCTAAAATTATT	2220
TTCCCATTCAACTATCAGAAACCAGGCAACCTGGCTGTTTATCCTGGGGAGGGGCAGGC	2280
AGGAGATCAGAACCTGTTTTTAGGCTTGCTTCCCTCCTTAGGTCTGCCTTTGGGAGCCC	2340
gSerAlaPheGlySerPr	

第 17 図 続き

TTTTGATCCTGCTACCCCTCTCTGAGGAGGAATCACGCCTCCTTTTGGCTGCAATGGTGAA oPheAspProAlaThrLeuSerGluGluGluSerArgLeuLeuLeuAlaAlaMetValAs	2400
TGACTATGAGCAGATGAAGGCCCGTGAGATGCAGAAGCAGAGGGCACAGGGCTCCGGGTA nAspTyrGluGlnMetLysAlaArgGluMetGlnLysGlnArgAlaGlnGlySerGl	2460
AGGTTCCCTGCCCCAAGGACAACAGGGGCATCCCTTTCTTCCTCTGGTCAGGCCCAGGAAGG CATATTTTAAAGTCACTTTTGAGTTTCTGACCCCCCTGGACATGTCTGTGGGATGATTA	2520
TGGCATTTCCTGACGGCCTAGGATTTTCTGCTGTGATGACCTTTTCTAGCAGAAATAC	2580
TCAAGGTTCACTGGTCCTCTCAAGGCAGTAGTCTTCCATGACGATTCTGTCTACAGCAC	2640
CTGCACTCAACCTCTCACTGACGGGCCTTTTCTTTCTTTATCCCACAAATCAGCATCAGT yileSer	2700
GTCCAGAAGAGATCCTGCAACACTGCCACCTGCATGACCCATCGGCTGGTGGGCTTGCTC ValGlnLysArgSerCysAsnThrAlaThrCysMetThrHisArgLeuValGlyLeuLeu	2760
AGCAGATCTGGGAGCATGGTGAGGAGCAACCTGTTGCCACCAAGATGGGCTTCAAAGTC SerArgSerGlySerMetValArgSerAsnLeuLeuProThrLysMetGlyPheLysVal	2820
TTTGGTGGGCGCCGCAGGAACCTTTTGGATCTGAGCAGTGGGATGATTCCAGGAGGAAGGT PheGlyGlyArgArgArgAsnPheTrpIle***	2880
GACTGCCCTTTTTGTACCTTCGGGTGGGAGGACAGAGGACTGGGTATTGCAGGGGTGCAT TCCACACCCTAACCCTCTGTGAGCGCATGGGGGTAAAACCTCCACATGGCAAGGTGCCCA	2940
CACCAGTGTCTGGAGAAAGGACTGATAATCCCTATAACTGAAACATTGGGCTCTTTCTCT	3000
CTGTTTCTCCAGTCTCTCCCTGTGACACTGACATCATCTGCCAGGAAATATAGACCTGT	3060
TTACTTAAACACTGTTCCCTGGGTATTAATTGGGGTCCAGCTCTAGCATTAGAATTTGA	3120
AAGGTAATGACCCTACCCTTTTGGAGCATACTTACAATGTTATGAACTTGGAGCATAGA	3180
CTCGGATTCAAATACTGTGTCTGTCTTCCACTAACTGTGACCATAGGCAAGTATGCCTCT	3240
GAGCCTCAGCTTCTCCTTGTAACCTGAAGGCAACAATAGTATCCTCAATATAAAAAATTAA	3300
TTAGTATAACATATGACAAGAGCCTGTTAAGTAAGAATTAATAACATTCTGTTACTTTTT	3360
TCCCTCCTAGGTTACTATGACTCTGAACTCTACTTCGTTTAATTTACAATGAAAGCAACC	3420
TACTAAAAAATAGCATGGAAGACATCCATGTATGCATGCTTCTGGAAACTGAAAACACTC	3480
TTTTCCTTGAAATAAACTAAACTAAATGCAAAATAAAATCAATGCATCAATGCAGTTAC	3540
CTTGTTGTCATCTTTTGTGTATATGATTCTATAATATGATGCATGTCTCATTAGGTTTAA	3600
TGGTAGCAAATCTGGCCCCTGTCAGCCAACCTGTTGGTGGGGCAGCTCTGCTAAACCTC	3660
AGGGTCACATGAATTC	3720
	3780
	3796

第 18 図

GGATCCACTAGTTCTAGATAAAATGGACAAATACCTAGAAACAGAAGACCTACCAAGATG	60
GAAGGATGAAGAAATAGAAAATTCAAATACACCTATGACTAGGAAGGAGAATGAAGCATT	120
AATCCAAAATCTTCCAACAAAGAAAAGCCCTGGATACGATGGCCTCATTTGGTGAATAGTA	180
CCAGACATTTAAAGAAAACGAATACCAATCCTTGTCAAACCTTTTCCAAAAACCTGAAGAG	240
AAAGGACACACCCTAACCTATTCTATGAGGCAGGCCAACATTACTCTGATACCAAAGATG	300
GAGAAAGATTCTGCAAGGAGAAAACCCCTACAGACAAAATCCTTTATGACATGGATGTGG	360
AAACCCTCAACAGTATGCTAGGGAATTGAATTCAGAAGCGTATTAAAAGGATCCTACAAC	420
ATGACCAAGTGGGATGAATTTCTGGAATGCAAGGATGATTCAAATATGAAAATTGATCA	480
AAGTGTATATCACATAATGGAATGTAGGGAAAAACACACCTGATTATTTCCACTGATA	540
CAGAAAATTATTTAGTAAAATTCAATACCTTTTCAGGATTAAAAACAAAACTAGGTATA	600
GAAGGAGACTGCCTCAGCACAATACACTATATATGAAAAACCAACACCAACACCATAAT	660
CCAGGGTGGAAAACGTAAAGCTTTTCCCCTAAGATCTGGAAGAAAATGGAAAAAAATTTT	720
TAAGAATTTTCAGACAGATTTGGGTCTCTGGTACACTCTGAGAAATCATCTTTTAGAATT	780
TTTTTTTTTTTAAAAATAAGCACAAGAATTTCAATTTAAAAGAAGGGAAATAACATAGCCTT	840
CAGAGTTTATCAGGAGGTGTAATTTTTCACACTAGATTGTGGCTACCTGATGCTA	900
ATTTTGAGGTTTAAACATAATGAAATAAGATTGTACAGCCAAGTGCCAGCTAGTCATGGA	960
ACTTTTACCTCAGTACTGTTTAGTGCTTCAGTCCTAAGAAGTTTCAGGGAGGGCTGCGTG	1020
CAATACAAGTAATCGGTACTTGCTGAAGGTCTAAAATTTTCGAGTGCACCTTGGTAAATCAG	1080
GGATGGGCGCAGAGGAGACTGGTTCTGTAACCTCAGACTAGTGAACCCTAGAATTTAGAAA	1140
GGGTACTTTTGTGCTCCAAGCAAATCCTGTTCTACCTAACTAGGTCCAAATGCTCTGCAG	1200
GCTGTAGTTAGAGCCCTCTCATAGCAGGGAGACTGCCTTGGTGAATCTGCCAGAGGAAAT	1260
GAATTTCCATTTCACATTCATTCAACAAACATTGGGCGAGTGCCACCTCATGTGCAAAACA	1320
TGGTGCTAAGTGCTAAAGAAAAGATGTTGTTTTGTAAACTTACCCGCAGCTCAGAGCCAG	1380
GACTTCTTGGAAGTCAAGAGGACTTGAGGAAGGAGTTTCATCTCAGCCCCCTCCCTCACTGG	1440
AGAGACTGGCTTTTCTTTCCAAGTAAAGCTTAAAACTGCTGGAGGCTAAGTTAGCACCTT	1500
CTGGGGGCAGACCCTGATTCCTGCCTCTCATCCCCAGCCCTTTGTGTGTGGGCGCCAAAG	1560
ATTTCTGAGTGAGGAATGAATGTTGGCTTTGAACAGGAAAGGCACAAAGTGGCAGCCAAGG	1620
GTAGAATGCTGAGCCTACAAATTAACATAGTTACAAATTTGTCTTCTAAAGGAGTCGTTT	1680
CTTAGCCATAGTGCAGCCACCTTTGCATTGATCAAACTGTGGTTCTTCCAATGAAAAAA	1740
GACATCCCCAGACACACATACTTACAAATGATTTTCAGAAGATTGATAGGTCGGAAATCTC	1800
AGGTTTTTGGATTTTATTTGCAAAAGCGTTTTGCGCCTGAGTTTTAACTTTTTTTTTTTT	1860
TTTTTTTTTTTGTATTTTTTCACTTCTAGGGCGGCTTCGGCGGCATATGGAAATTCCCAG	1920

第 18 図 続き

GCTAGGGGTCTAATAGGCGCCATAGCCACCGGCCTACGCCAGAGCTACTGCAACGCTGGA 1980
 TCCGAGCCGCATCTGCAACCTACACCACAACTCACGGCAATGCCGGATCGTTAACCCTACT 2040
 GAGCAAGGCCAGGGATCGAACCCGCAACCTCATGGTTCTTACTCAGATTCGTTAACCCTACT 2100
 GCGCCACGACGGCCACTCCAACCTACCAGACTCTTAATTAAGTAGCAGAGTCCAATTTAC 2160
 ATGCCGCACCACATCTGTTACCCCGAGTTAGCGAACTTGGTCTTGGAACCTAACCCTCAC 2220
 GGAAAGCCAAGCCGAGTACTCATAATTATAGTGCTGAACCCCCAAACCCTGGTCTGGCCT 2280
 GTGCACCCAATTTTTGCTTGTAGTAGAAACCAGGATTTACGGAGCCCGAGCAGTCCGCCA 2340
 TCCTGAACTCTTCTCTTTCTCACCTTGCCCTTCATCCTGGAGTGACCTGCCCTCTATGAA 2400
 CCAGTTTTTCCGTTCCCTTGGTCTCCCGATCCGTTGTCTATCTGAGGAGAGCGAGATGC 2460
 AAGCACCCGATTCCTTAGCCCCAATATTTTTATTCTCTTGCGAAGGAGAAAAGTTGAATAA 2520
 GGGTATCTTGTAATGAGATGTTCCGAGTCCAGAGAGCACAAACCGGCAAGGGGAACAGA 2580
 TGTGCCGCGAGGCAGGTGTGCGGAAAGATATAGAGAAGGCTCAGGTTTCGGACCTGTGGCT 2640
 CAGGTCACACTCATGGCAGAGTTCGGTTTAATTTTCGGCTCTGCCCTGGGGGAACCACTTAA 2700
 CTGGGGTCCCTTGCTGCCCTCCACCGGCCCCCGATGCTGTTGCAGCGTTTGCCGCGCTGGA 2760
 GGGTCTGTACAGGCTGCTGCGGTTTATCGCTGTGTGCTCAGACACGGTGATCCTGAGCAG 2820
 CATCCGAACCTGGATTGGGGTAGATGTGGGCACAGGGCTGGAATCACAGGTCCTGGAACA 2880
 TCTTGCCAAACAGCAGCCGGAAGCAAGGGGCAGCTGGGCAAATGGTTCTGGGACATTGAT 2940
 GGGCTTAGATGATGAATGGTGGGGCTGGAGGTCGGCTTGCGGGCTTGGGAAGCATCTATG 3000
 CCGTGACAGTCCCTGCCCAAGCCCAGTAGGGCACCATCTTTCCCATATGGTGGAACCGAC 3060
 CACCCAGCGCGACTCCAGACATCCGCACAGAGGTGGGGATTGGGCAAATGGATCGCGATC 3120
 GCACAGAATCCCCTCTGCACTTCCCTGGTAAGCTCTTCTCGATCCCTCCCTGGGTGGAGA 3180
 GCAGGTACATGGCTACTAATGATACCACTCCTTGAAGACGGGAATATGATGCCCCGTTCC 3240
 AAAAATTAATATATTGAGGTGCTAGAAGACACTAGCCCGATGATCTTACTACCTAGAAAA 3300
 GGCACAGCTGGAACAAAGTTTCCGTGTGACAAAGACTGTGATCCTGCCTCTTGTTTCCCA 3360
 CAAATCCTGCCTTCCCTGTGCTTGATTCCAGCTGCTGAATCAGACCCCCCTGCTTGGGCAC 3420
 AGAATCATCAACCTGCTGCGCATTAACCTCCCAAACCGCACTTGGACATGGTAGTCTTAG 3480
 GGGACCGGGGATGCCTTGTAACGCTGGACTCTGCTCTACAAAGATCACATAGCTGGGGAT 3540
 GGAGAGGGATGTGAGCCTGCGAAACCGAACAGGTAAAGTTTACCATGACGTCAAACCTGTC 3600
 CTTAAATTCTGCTCACTTTGCGTGTGTTTTTCGTTGGTGCCACCAACCTCCCCACCCC 3660
 CTCCCACCCCCGCCATCAATGACCTCAATGCAAATACAAGTGGGGTGGTCCTGTTGGATG 3720
 CTCCAGGTTCTGGACGCAAGTAGTGACACAATCCTGGGGCTCAGGATCTTTCCTCTCAT 3780
 GGTTGCCTGGAGCTCTGGGACCACCCAGATTCAGAGCGGCGGGAATAAGAGCAGCTGCT 3840

第 19 図

GGTGCGGGGAAGGGTTAGAGGCACTACCCACCTCAAGTGTCTCTGCCGCTTCTTCCACAG 3900
 TGCCATCGCCTGACGCCAACGCTGCTGCCCTCTGCTCCCTCCTCTGCTCCAGTCCACCTGG 3960
 TTCCTGCTGCCCCGTAAGCCCGGAGATTCCCTGCTAAGCTGTGGTTCTGTTTCTCTCTCCC 4020
 TCTCCTCCCTTCCCTCTCTCTCCATTGGATTTTCTTAGCTGATCTCTTTTCCCGTCTCAA 4080
 AGTTCTGTCCACTTCTCTCTGGGTCTCTTCATCCTGTAATATGCCTTACTGCGCAATTC 4140
 ATTCTAGGCTCCTTTACAGGTAACCTCTGGATGGTCTCAGTTTCGGGGATTCCCTGCTCTA 4200
 CTCTTCTGAGCTGAGCTGGGCTCCAGTCTTGTCCCCGCAGCAGACGTGCTTAGGTCCGT 4260
 GTTGGGATTTTGGAGCTCTCCAGGCACTTCAGGGAGAGGAGGATGCAGGAATAGCTTTGA 4320
 GCAGAAGAACTTTTCATGGATCCCATCTCCTCTTACCTACAAGGATCGCTGGAAATGGGG 4380
 TCGGGACCTGGGACAGTGCAAATGGGTGGCAAATAGGTGCAATGACTGAGGGGAAAGTAG 4440
 CTATTAAACGCAAGCCCCAGTTGAAGGTTCCTGGGAACTCCCCCTCCCGCACC GCCACCCC 4500
 ATTTAATCTTGGGTCCCAATTTAAGGCTGTACCGGCTTGTTCCTTACAGGGTGTCTTTG 4560
 CCAGAGTATGGAGCAGCTGGACAGTAAATTTGGTTCTTCAGTTTCTCAGGGATTCCAAC 4620
 TGCAGAGATATGTCTCCCAACTCCCCCTTCCCCCAGCCAGGTATAAGCAAAAATCAGGC 4680
 ATCAGGAGAGATGCTGATGGGTGCACTATGGGAAAAGCTGTGGTGACAGGTACTGTGAG 4740
 TCTGTCTCCAGGAGTCCCGGCCAACAGGTTGAAGGTGAGAGTGTGGGTGTGCTGGGCAG 4800
 GGGGCTATGGACGGAGACCTTCTCACCAGTTGTCTCTGCTAGGCTTCTTTGCTAAACCAA 4860
 GCATGTTGCAGGCTCACTGGATCTTCCAGCAGTCCACTTGGCTGAGGAGGAAATGATGGT 4920
 GAAAGGAAAGGACACGAGCAGCTGAAGCCAGGAAGCCAGGGAGTTGGAGGCAGAGGCAG 4980
 GAGCAGAGCCCAGGTCTGTGGGCTCAATGAACCTTGAAGTGTACAGGTGGTGACATTGT 5040
 TCTTCCCTTGCAGAGGGGCACCATGGGCTTCTGGAAATTTCCGCCCTTCTGTTCTCAG 5100
 MetGlyPheTrpLysPheProProPheLeuValLeuSe

CATCCTGGTCCTGTACCAGGCAGGCATGTTCCACACAGCACCCGTGAGGTAAGACAGCAC 5160
 rIleLeuValLeuTyrGlnAlaGlyMetPheHisThrAlaProValAr

TGGTGGCAGTGTCTCGCTTCCACGGCCCCCGGAATCATATAGTTCTGTATTGTGAGTT 5220
 GTGCTGTGGTGAGTCTGGCTCTTGGTGGGCTTCTGTGTATAGGGGGTGTGGGGTCCATAAT 5280
 GTATGAATATAGTCATGTATATAAGTTTATTATAAATATTTTGTGATCCAAGATAATATC 5340
 ACAAAGTTTACAAATAAATAGAAGATATACAGTATTCACTATAAATTTCTAAACTCACTG 5400
 AACCTTACAGCATGTTTGTGCTTTTATGAAATGTTTATAACTTTAGCAAACCTATA 5460
 TAGTAATTTAGCCATAATTTGAGCAATGAATTGCATTCTAATTAAGTAATTTGTCAATAA 5520
 ATTTGTTATTAAATCTGAAAGGTAATCTATACAATTTCTCACCCCTCTTTCAAATTATATT 5580
 AATATGAAACCATTTTCATATTCAAACCTATCATTTAATTTTAAATAATGGCTGTATTAA 5640
 CACTAAGCTCATACAATTCCTGAAGATCTAACCATCAGCTTTCAAAGCCTACATGATGC 5700
 ACTTTACAGCAGAACTACTTTGTGGACACCCCAGAGCCTAACTCATGGTGAAGCAGCATTT 5760
 TTGGATGAACACTAGCCTTATGTCTGACCGTTGAGAATTTTCATCAGCCTTATTCTCAGA 5820
 GGAAGTGGCAGAAACCAGGAAATCTGGCTGCTTATCCTAGGGCTGTGGTAGGCTCAGAGC 5880
 GCATGTTGGGCTTGCTTTCCCTTCCAGATTGCCTTTGGAGAGCAGCTTTGATTCTGCCA 5940
 gLeuProLeuGluSerSerPheAspSerAlaT

CTCTCACAGAGGAGGAAGTGTCCCTTCTACTGGTTGCAATGGTGAAGGATTATGTGCAGA 6000
 hrLeuThrGluGluGluValSerLeuLeuValAlaMetValLysAspTyrValGlnM

第 19 図 続き

TGAAGGCCACTGTGCTGGAGCAGGAGTCAGAGGACTTCAGGTCAGTCTTTGCACCCCTCC 6060
etLysAlaThrValLeuGluGlnGluSerGluAspPheSe

CAGAAATATGGCTTACCCTCTCCCTAGAGTACCAGGAAGGCATATCCTTAAGAATGAGATT 6120
TGTTATAGTGCCATAAGCCTTGATGTCCAGTCTCATAAGCCTTGTTTATTTTTAGTTTA 6180
TTACACAGGAGAGATTGTCTATTACAGTTCTGATTTCCAGGTCCAGTAATGCAGAGCCAC 6240
CTTTGGGTTTTCTGACACCCCTGAAAATGTCTATGGGGAGTGATGATGCATTTTCCCAA 6300
AGCCCTATGGTTTTCTGTTGGGATTTTGTGTTTAGCAGAAACATTTTCAGGTTCACTGGTC 6360
CCTCTCAGAGCTGTAATTTTCCACTGATGGTCAGTCCTGGGGGAATCACTTGCCCTCAA 6420
GCTGTCATTGGCAGGCCTTCTCTTTGTCTCCATCCTGAAAATCAGCATCACTGCCCAGGA 6480
rIleThrAlaGlnGI

GAAATCCTGCAACACTGCTAGCTGTGTGACCCACAAGATGACAGGCTGGCTGAGCAGATC 6540
uLysSerCysAsnThrAlaSerCysValThrHisLysMetThrGlyTrpLeuSerArgSe

TGGGAGCGTGGCTAAGAACAACCTTCATGCCACCAATGTGGACTCCAAAATCTTGGGCTG 6600
rGlySerValAlaLysAsnAsnPheMetProThrAsnValAspSerLysIleLeuGly**

ACGCCGCAGAGAGCCTCAGGCCTGAGCTGTGAAATGACTCCACAAAGAAGGTGACTGCTC 6660
*

TAGAACATGGGATAGCAGGGCAAATGGCTGGGTATTTTCAGGGGTGTTGGCTACACTCTAA 6720
CCCTCCCTGAGCCTGTACTGTAAAAAAAATCCATAATGAAGTTGCTGACCCCATTTATCC 6780
TCAGAAAGAAAAGAGAATCCTAATAGCCAAAACCCCTATAACTTAGGTTTCATTTCTATTT 6840
TTTTCCAGTGTCTCCAGTGAAGTCTGAGGTCATCTGTCAGGAAACATAGATTCTATTCTT 6900
TTTTCTTTTCTTTTTGGCTACACCCAAGGCATGTGAAAGTTTTTGGGCCAGGGATTGAAT 6960
CTGAACCATAGCTGTGACCTATGCAGTACCTGTGGCAACACTGGATCCTTAACCCAATGT 7020
ACCACATCAGGAACCTCCTAGGTCCTATTATTTAAACACTGTTCCCTGCAGTTATAATTG 7080
TGATTATTCTAGTTTTTGGAGTTTGAAAGGTAATGATCTTATCCAGTGAGTTTGAAGTATA 7140
ACTACAATGTCACATATATCTGAATTCAGAGCATTTGACTTGGTTTTCAAATGCGATGTCTG 7200
TCTTCCACTAACTATAACAACCATGGGCCAGACCCCTCTCTGAACCTCAGTTCTACATGAAA 7260
CTTTAAGGCAACAATAATATTTACCTGTTATCATTAATATAAAAAGTAACTGAGATAATT 7320
CATGGTAAGAGCCTCACTATTAATAAGTAATAATAATTCTAGCTCTTATTTTTTTTCTCC 7380
TAGGTCACCAAGGAACCTGAAGTCTATTTCTTTTAATCTGCAATGAAAGCAATTTATTTGA 7440
AAAATAGCATGGAAAACACACATATATGCATGCTTCTTGCTTGAAATACAGCTTTTAGCT 7500
TGAAATAAACTAAAATAAATGCAGAATAAAATCATTGCAGCTACCTGATATGTATCATT 7560
TTAATATTTGATTCTGTATTCTATAAGTATGACTCATGTCTCGCTGGCTTATCTGGTAGC 7620
AAATCTGGACCCTGTGAGCCAACCTGTTGGTGGTGGCAGCTCTGCTAAACCTC 7673

第 20 図

CTCAAGTGTCTCTGCCGCTTCTTCCACAGTGCCATCGCCTGACGCCAACGCTGCTGCCTC	-52
TGCTCCCTCCTCTGCTCCAGTCCACCTGGTTCCTGCTGCCCAGGGGCACCATGGGCTTC	9
M G F	3
TGGAAATTTCCGCCCTTCCTGGTTCTCAGCATCCTGGTCCTGTACCAGGCAGGCATGTTTC	69
W K F P P F L V L S I L V L Y Q A G M F	23
CACACAGCACCCGTGAGATTGCCTTTGGAGAGCAGCTTTGATTCTGCCACTCTCACAGAG	129
H T A P V R L P L E S S F D S A T L T E	43
GAGGAAGTGTCCCTTCTACTGGTTGCAATGGTGAAGGATTATGTGCAGATGAAGGCCACT	189
E E V S L L L V A M V K D Y V Q M K A T	63
GTGCTGGAGCAGGAGTCAGAGGACTTCAGCATCACTGCCCAGGAGAAATCCTGCAACACT	249
V L E Q E S E D F S I T A Q E K S C N T	83
GCTAGCTGTGTGACCCACAAGATGACAGGCTGGCTGAGCAGATCTGGGAGCGTGGCTAAG	309
A S C V T H K M T G W L S R S G S V A K	103
AACAACTTCATGCCCACCAATGTGGACTCCAAAATCTTGGGCTGACGCCGCAGAGAGCCT	369
N N F M P T N V D S K I L G	117
CAGGCCTGAGCTGTGAAATGACTCCACAAAGAAGGTCACCAAGGAACTGAACTCTATTTTC	429
TTTAAATCTGCAATGAAAGCAATTTATTTGAAAAATAGCATGGAAAACACACATATATGC	489
ATGCTTCTTGCTTGAAATACAGCTTTTAGCTTGAAATAAACTAAACTAAATGCAGAATA	549
AAATCATTGCAGCTACCTGAAAAAAAAAAAA	579

第 21 図

GCCCAGCTTACGTCTCCTTTCTCCGCCAGTGCCATCACCTGCCACCAGCGCGGTTGTTGC -52
 TTCTCCCACTTGGGCTCCAAGCTACCTGGTTCTGCATCCAGAGGGGCACCATGGGCTTC 9
 M G F 3


TGGAAGTTCCCCCCTTCCTGATCCTCAGCATCCTGGTCCTGTACCAAGCAGGAATGCTC 69
 W K F P P F L I L S I L V L Y Q A G M L 23

CATGCCGCGCCATTCAGGATGGCTTTGGGAAGCAGCTTTGATTCTGCCACACTCACGGAA 129
 H A A P F R M A L G S S F D S A T L T E 43

GAGGAAATGTCCCTCCTACTGGTTGCAATGGTGAAGGATTATGTGCAGATGAAGGCCACT 189
 E E M S L L L V A M V K D Y V Q M K A T 63

GTGCTGGAGCAGGAGACAGAGGACTTCAGCATCACCACCCAGGAGAGATCCTGCAACACT 249
 V L E Q E T E D F S I T T Q E R S C N T 83

GCCATCTGTGTGACCCACAAGATGGCAGGCTGGCTGAGCAGATCTGGGAGCGTGGTTAAG 309
A I C V T H K M A G W L S R S G S V V K 103

AACAACTTCATGCCCATCAACATGGGCTCCAAAGTCTTGGGCCGCGCCGCAGACAGCCT 369
N N F M P I N M G S K V L  R R R R Q P 123

CAGGCCTGAGCTGTGAAATGACTCTAAAAAGAAGTTGAACTCAAGTTGCTTTCACTGCAA 429
 Q A * 125

AGTTGCTTTCCCTGCAAATTAAAAGAACCAATTTGAAAAATAGCATGGAAGACACACATA 489
 TATGCATGCTTCTTTGCTTGAAATACAACCTTTTGCCTTGAAACAACTAAACCTAAATGCA 549
 GAATAAAATCATTCAGTTACCTGA 574

第 22 図

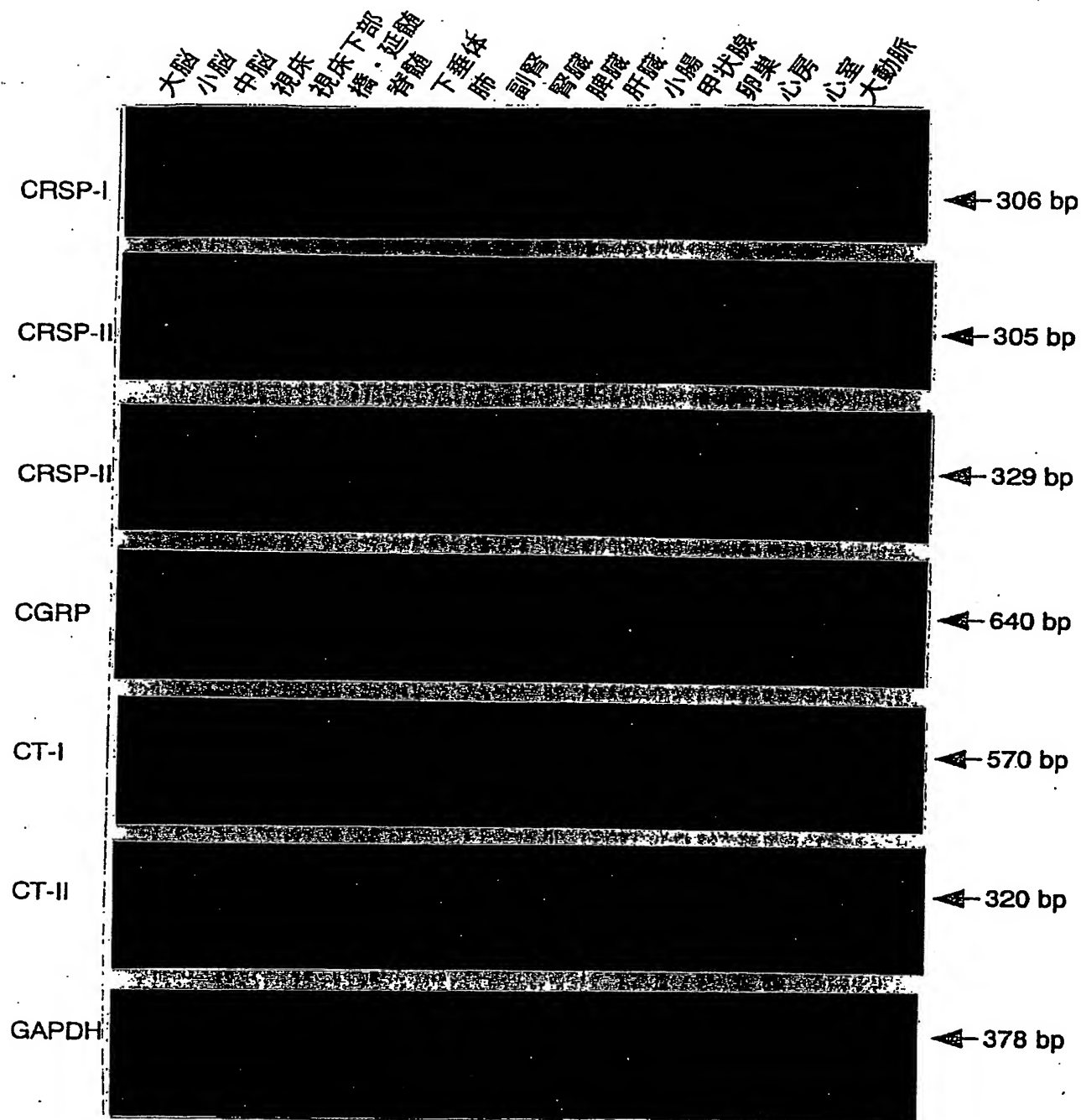
CCCCAGCTTACGTCTCCTTTCTCCGCCAGTGCCATCACCTGCCACCAGCGCGGTTGTTGC	-52
TTCTCCCACCTTGGGCTCCAAGCTACCTGGTTCTGCATCCAGAGGGGCACCATGGGCTTC	9
M G F	3
TGGAAGTTCCTTCTGATCCTCAGCATCCTGGTCCTGTACCAAGCAGGAATGCTC	69
W K F P P F L I L S I L V L Y Q A G M L	23
CATGCCGCGCCATTTCAGGATGGCTTTGGGAAGCAGCTTTGATTCTGCCACACTCACGGAA	129
H A A P F R M A L G S S F D S A T L T E	43
GAGGAAATGTCCCTCCTACTGGTTGCAATGGTGAAGGATTATGTGCAGATGAAGGCCACT	189
E E M S L L L V A M V K D Y V Q M K A T	63
GTGCTGGAGCAGGAGACAGAGGACTTCAGCCTGGACAGCTCCAGAGCTAAGCAGTGCAAT	249
V L E Q E T E D F S L D S S R A K Q C N	83
AATCTGAGTACCTGTGTGCTGGGAACATATACATGGGACGTCAACAAGTTTTATGCATTC	309
N L S T C V L G T Y T W D V N K F Y A F	103
CCCTTAAC TACA ACTGGGATTAGAGTATCTGGCAAGAAATGGGTCAGGGCCAGAGTCTCA	369
P L T T T G I R V S K K W V R A R V S	123
GAGAAAGTCCATTATCCCTCAAGGCAGCATACCCTAAGGTGCTTAAGAAGGCCCCACCC	429
E K V H Y P S R Q H T L R C L R R P P P	143
CTCCTCCTTTCTAGTTCTCTCCTAGAAATTTGCATGTGTTCTTCTCTGGTTGCTCTCTGA	489
L L L S S S S P R I C M C S S L V A L	162
GCTGCTATCAGCAGCTTTCTTGTGGCCATGGATGTCTGGAATATCAGAGAGGAGGTGGG	549
GGGTGGGGGCGAGGCAGGCCAGAAGAAAATCACTCAGGAATAGATTAGGAGAGAATGGGCA	609
GCCCTGTGAGTGCCTGTGGATTTACAGCAGAGCTTCTCAGTCCTGCTTCTGAACATGCT	669
TTTCACTAGGGAATAAAAGTAT	691

第 2 3 図

YRQSMNFFQGLRSEFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDGVAPRSKISPQGY-NH₂
 SCNTASCVTTHKMTGWLRSRGSVAKNNEFP-TNVDSKIL-NH₂ pCRSP-2
 SCNTAICVTHKMAAGWLSRGSVVKNNNEFP-INMGSKVL-NH₂ pCRSP-3
 SCNTATCMTHRLVGLLSRGSVMVRSNLLP-TKMGFKVFG-NH₂ pCRSP
 SCNTATCVTHRLAGLLSRSGMVKSNEFP-TDVGSEAF-NH₂ pCGRP
 pAM

CSNLSTCVLSAYWRNLNNEHREFSGMGFGPETP-NH₂ pCT
 pECNNLSTCVLGTYTWDVKNKFYAFPLTTTGIRVS-NH₂ pCT-2

第 2 4 図



10/516768

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science And Technology Corporation

<110> Japan as represented by President of the National Cardiovascular
Center

<120> A New Peptide Having Production Activity of cAMP

<130> JA905066

<150> JP2002-162797

<151> 2002-06-04

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 38

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<221> modified amino acid

<222> (38)

<223> glycine amide

<220>

<223> CRSP

<400> 1

Ser Cys Asn Thr Ala Thr Cys Met Thr His Arg Leu Val Gly Leu Leu.

1

5

10

15

Ser Arg Ser Gly Ser Met Val Arg Ser Asn Leu Leu Pro Thr Lys Met

20

25

30

Gly Phe Lys Val Phe Gly

35

<210> 2

<211> 39

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<223> CRSP-Gly

<400> 2

Ser Cys Asn Thr Ala Thr Cys Met Thr His Arg Leu Val Gly Leu Leu

1

5

10

15

Ser Arg Ser Gly Ser Met Val Arg Ser Asn Leu Leu Pro Thr Lys Met

20

25

30

Gly Phe Lys Val Phe Gly Gly

35

<210> 3

<211> 679

<212> DNA

<213> Swine

<220>

<223> CRSP cDNA

<400> 3

tcaagtgctt ctgccgttc ttccacagtg ccatcgccig acgccaacgc tgcigccctt 60
gtccccctct ctgctccagt ccacctgggt cctgctgccc gaggggcacc atgggcttct 120
ggaaatttcc gcccttccgt gtcttcagca tcttggtcct gtaccaggca ggcatgttcc 180
acacagcacc aatgaggctt gcctttggga gcccttttga tcttgctacc ctctctgagg 240
aggaatcagc cctccctttg gctgcaatgg tgaatgacta tgagcagatg aaggcccgtg 300
agatgcagaa gcagagggca cagggtcccg gcatcagtgt ccagaagaga tctgcaaca 360
ctgccacctg catgacccat cggctggtag gcttgctcag cagatctggg agcatggtag 420
ggagcaacct gtgcccacc aagatgggct tcaaagcttt tggtaggcgc cgcaggaact 480
tttggaatcg agcagtgga tgattccagg aggaaggta ctatgactct gaactctatt 540
cgtttaattt acaatgaaag caacctacta aaaaatagca tggagacat ccatgtatgc 600
atgcttctgg aaactgaaaa cactcttttc ctigaaataa actaaaacta aatgcaaaat 660
aaaatcaatg catcaatgc 679

<210> 4

<211> 126

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<223> precursor peptide of CRSP

<400> 4

Met Gly Phe Trp Lys Phe Pro Pro Phe Leu Val Leu Ser Ile Leu Val

1

5

10

15

Leu Tyr Gln Ala Gly Met Phe His Thr Ala Pro Met Arg Ser Ala Phe

20

25

30

Gly Ser Pro Phe Asp Pro Ala Thr Leu Ser Glu Glu Glu Ser Arg Leu

35

40

45

Leu Leu Ala Ala Met Val Asn Asp Tyr Glu Gln Met Lys Ala Arg Glu

50

55

60

Met Gln Lys Gln Arg Ala Gln Gly Ser Gly Ile Ser Val Gln Lys Arg

65

70

75

80

Ser Cys Asn Thr Ala Thr Cys Met Thr His Arg Leu Val Gly Leu Leu

85

90

95

Ser Arg Ser Gly Ser Met Val Arg Ser Asn Leu Leu Pro Thr Lys Met

100

105

110

Gly Phe Lys Val Phe Gly Gly Arg Arg Arg Asn Phe Trp Ile

115

120

125

<210> 5

<211> 3796

<212> DNA

<213> Swine

<220>

<223> gene CRSP

<400> 5

ctcaggagatc ctcctctctg tttccacaa atcctgccit cctgtgcttg attccagctg 60
cctgaatcag accccctgct tgggcacaga atcatcaacc tgcigcgcat taacctccca 120
aaccgcactt ggacatggta gtcctagggg accggggatg ccttgtaatg ctggactctg 180
cctacaaag atcacatagc tggggaatga gagggatgtg agcctgcgaa accgaacagg 240
taaagttaac catgacgtca aactigcctt aaattcctgc tcactttgcg tgtgtttttc 300
gttgggtgccc accaacctcc ccacccccic ccacccccgc catcaatgac ctcaatgcaa 360
atacaagtgg ggtggctctg ttggatgctc caggttctgg acgcaagtag tgacacaalc 420
ctggggctca ggatctttcc tctcattggt tgcctggagc tctgggacca cccagattc 480
agagcggcgg gaataagagc agctgtctgt gcggggaagg gttagaggca ctaccacct 540
caagtgtctc tgccgcttct tccacagtgc catcgctga cgccaacgt gctgcctctg 600
ctccctctc tgcctcagtc caccitgttc ctgcigcccg glaagcccg agattcctgc 660
laagctgtgg ttctgtttct ctctccctct cctcccttcc ctctctctcc attggatttt 720
cttagctgat ctcttttccc gctcacaagt tccgtgccac ttctctcttg gtctcttcat 780
cctgtaatat gccctactgc gcaattcatt ctaggtcctt ttacacaggta actctggatg 840
gtctcagttc ggggattccc tgccttactc ttccctagct gagctgggct ccagctctgt 900
ccccgcagca gacgtgccta ggtccgtgtt gggattttgg agctctccag gcacttcagg 960
gagaggagga tgcaggaata gctttgagca gaagaaactt tcatggatcc catctcctct 1020

tacctacaag gatcgctgga aatggggcgc ggacctggga cagtgc aaat gggtggcaaa 1080
taggtgcaat gactgagggg aaagtagcla ttaaacgcaa gcccagttg aaggctctgg 1140
gaactcccc tccgcaccg ccaccccatl taatctggg tcccaattta aggcgttacc 1200
agcttgtttc ttacagggig ctccttgcca gagtatggag cagctggaca glaaaatttg 1260
gtctctcagt tctcagga tccaactgc agagatatgt cctcccaact cccctcccc 1320
ccagccaggt ataagcaaaa atcaggcatc aggagagatg ctgatgggtt gcactatggg 1380
aaaagctgtg gtgacaggta ctgcgagict gtctccagg agtcccgccc aacaggttga 1440
aggtagagat ggggtgtgc tgggcagggg gctatggacg gagacctct caccagttg 1500
tctgtctagg ctctttgtc aaaccaaaca tgttgcaggc tcatggatc tccagcagt 1560
ccacttggct gaggaggaaa tgatggtgaa aggaaaggac acgagcagcc tgaagccagg 1620
aagccaggga gtggaggca gaggcaggag cagagcccag gtctgtgggc tcaatgaact 1680
tggaactgct acaggtggig acattgttct tcccttgag aggggcacca tgggttctg 1740
gaaatttccg cccctccgg tctcagcat cctggctctg taccaggcag gcatgttcca 1800
cacagcacca atgaggtaag acagccctgc caacaagcac actcactga tgagaatga 1860
atataaacgt gtataaaat ttattataag gtggctctgt agaacaatgg atagtgcctt 1920
gcgtctctat aagtttatca taagctttat gtgtacacaa agtttgtaaa tagacataag 1980
atatacagta ccatgatig taaattttat alaacttate aaacctcaca gcatgtttt 2040
ttgttttcat caaatatttg tacttttagc acacgtatat gctcatatta ccataattta 2100
agaaatggat tgalccaat ttgccaaata ctltgctagt aaatttgtta ttaaatcga 2160
tatgggaict acacatctca ttttccact tcatcacaac tgcattgaag taaaattatt 2220
tccccatca aactatcaga aaccaggcaa cctggcgtt tatcctgggg aggggcaggc 2280
aggagatcag aacctgttt taggcttgc tccccctt aggtctgcct ttgggagccc 2340
tttgtatct gctacctct ctgaggagga atcacgcctc cttttggctg caatgglgaa 2400
tgactatgag cagaigaagg ccgtgagat gcagaagcag agggcacagg gctccgggt 2460
aggttcccig cccaaggaca acagggcatc ccttcttcc tctggtcagg ccaggaagg 2520
cataatttaa agtcacttt gagttttcgt accccccgg acatgtctgt gggatgatta 2580
tggcatttcc ctgacggcc taggatttct tgcgtgatg accttttcta gcagaaatc 2640
tcaaggttca ctggctctct caaggcagta gtcttccatg acgattctgt cgtacagcac 2700
ctgcactcaa cctctcactg acgggcctt tctttctta tcccacaaat cagcatcagt 2760

gtccagaaga galccigca actigccacc tgcattgaccc atcggcigg gggcttgc 2820
 agcagatcig ggagcatggg gaggagcaac ctgttgccca ccaagatggg cticaaagtc 2880
 ttgggtgggc gccgcaggaa ctlttggatc tgagcagttg gatgattcca ggaggaaggt 2940
 gactgccctt ttgtacctt cgggtgggag gacagaggac tgggtattgc aggggtgcat 3000
 tccacacctt aacctctgt gagcgcatgg gggtaaaacc tccacatggc aaggtagcca 3060
 caccagtgc tggagaaagg actgataatc cctataactg aaacattggg ctctttctct 3120
 ctgtttctcc agtctctccc tgtgacactg acatcatctg ccaggaaata tagacctgt 3180
 ttacttaaaa cactgttccc tgggtattaa ttgggttcca gccttagcat tagaattga 3240
 aaggtaaiga ccttacctt ttggagcata ccttacaatg ttatgaactt ggagcataga 3300
 ctggattca aatacttgt ctgtcttcca ctaacttga ccataggcaa gtagccctc 3360
 gagcctcagc ttctcttgt aacttgaagg caacaatagt atcctcaata taaaaattaa 3420
 ttagtataac atatgacaag agcctgttaa ctaagaatta ataacattct gttactttt 3480
 tccctctag gttactatga ctctgaactc tacttctgtt aatttacaat gaaagcaacc 3540
 tactaaaaaa tagcatggaa gacatccatg tatgcatgtc tctggaaact gaaaacactc 3600
 ttctcttga aataaactaa aactaaatgc aaaataaaat caatgcatca atgcagttac 3660
 ctgtgtgca tcttttgtgt atatgattct ataataatgat gcatgtctca ttaggtttaa 3720
 tggtagcaaa tctggccctt gtcagccaac ctgttggigg gggcagctct gctaaacctc 3780
 aggtcacat gaattc 3796

<210> 6

<211> 40

<212> PRT.

<213> Bos sp.

<220>

<223> BosCRSP

<400> 6

Ala Cys Asn Thr Ala Thr Cys Met Thr His Arg Leu Ala Gly Trp Leu

1

5

10

15

Ser Arg Ser Gly Ser Met Val Arg Ser Asn Leu Leu Pro Thr Lys Met

20

25

30

Gly Phe Lys Ile Phe Asn Gly Pro

35

40

<210> 7

<211> 649

<212> DNA

<213> Bos sp.

<220>

<223> BosCRSP cDNA

<400> 7

tgctctgcc actctgcc aactgccact gccctgcc aaagctactg ctgctgctcc 60
 ttccctctgct cccagccacc tggcgccggc tgcagagag gtgtcatggg ctctcggaag 120
 ttcccccat tcttggtcct cagcatccig gctctgtacc aggcaggcat gtttcatgca 180
 gcaccattca ggctcgtctt tgaigggcgt ttgaltctg ctaccctgga tgaggaggaa 240
 tcgcgcctcc tactggctgc gatggigaat gactacgagc agatgagggc ccgggagtcg 300
 gagaaggctc agaagaccga gggctcccg caccagaaga gagccigcaa cactgccacc 360
 tgcatgacct atcgcciggc aggciggtc agcagatcig ggagtatggt gaggagcaac 420
 ttgctgccga ccaagatggg ttcaagatc ttcaatgggc ccgcaggaa ctcciggttt 480
 taaacagtga aatgacgctg ggaataaggt caccaggaag ctgaactcia cttttagttt 540
 gcatgaaggc accttacaaa aaaagaaaat agcatggaag atacccatgt atgcatgctt 600

ctcgatattg aaaacattcctttttccct gaaataaact aaatgcaga

649

<210> 8

<211> 125

<212> PRT

<213> Bos sp.

<220>

<223> precursor peptide of BosCRSP

<400> 8

Met Gly Phe Trp Lys Phe Pro Pro Phe Leu Val Leu Ser Ile Leu Val

1

5

10

15

Leu Tyr Gln Ala Gly Met Phe His Ala Ala Pro Phe Arg Ser Val Phe

20

25

30

Asp Gly Arg Phe Asp Pro Ala Thr Leu Asp Glu Glu Glu Ser Arg Leu

35

40

45

Leu Leu Ala Ala Met Val Asn Asp Tyr Glu Gln Met Arg Ala Arg Glu

50

55

60

Ser Glu Lys Ala Gln Lys Thr Glu Gly Ser Arg Ile Gln Lys Arg Ala

65

70

75

80

Cys Asn Thr Ala Thr Cys Met Thr His Arg Leu Ala Gly Trp Leu Ser

85

90

95

Arg Ser Gly Ser Met Val Arg Ser Asn Leu Leu Pro Thr Lys Met Gly
100 105 110

Phe Lys Ile Phe Asn Gly Pro Arg Arg Asn Ser Trp Phe
115 120 125

<210> 9

<211> 38

<212> PRT

<213> Canis sp.

<220>

<223> CanisCRSP

<400> 9

Ser Cys Asn Ser Ala Thr Cys Val Ala His Trp Leu Gly Gly Leu Leu
1 5 10 15

Ser Arg Ala Gly Ser Val Ala Asn Thr Asn Leu Leu Pro Thr Ser Met
20 25 30

Gly Phe Lys Val Tyr Asn
35

<210> 10

<211> 686

<212> DNA

<213> Canis sp.

<220>

<223> CanisCRSP cDNA

<400> 10

```
tctgccacat ccacgggtgcc atcgccctgac atcggacgcc aacactgcc aagctgccgc 60
cgccctgtgt cagagccacc ggcctgctgc agacagagaa gcgtcatggg ctcttggaag 120
ttctcccttt tcttggttct cggcatcctg gcgctgtacc aggtgggctt cctccaggca 180
gcaccattca ggctcgtctt ggaaaaatcct ccagactctg gtgtgcgcaa tgaggaggaa 240
ttgcgcttcc tcttggtctg agtgatgaag gactatagc agatgaagac tcatgagctg 300
gagcaggagc aggagactga gggctccagg gtgtgtgtcc agaagagatc ctgcaacctt 360
gccacctgtg tggcccatig gctgggaggc ttgttgagca gagccggaag tgtggcaaac 420
accaacttgc tggccaccag catgggcttc aaggcttaca atcgacgccg cagggaactt 480
aaggcttaag cagtacatg accccaggaa gaaggctacc atgaagtga ccttacttct 540
cttaacttct aatgaaaaca acttatagaa tgcagagcat ggaagacaca tacataigca 600
tgcttactat taaaacattg tgccttgctt gaaataaagt aaaactaaat aaagagaata 660
aatcataaa aaaaaaaaaa aaaaaa
```

686

<210> 11

<211> 127

<212> PRT

<213> Canis sp.

<220>

<223> precursor peptide of CanisCRSP

<400> 11

Met Gly Phe Trp Lys Phe Ser Pro Phe Leu Val Leu Gly Ile Leu Ala
1 5 10 15

Leu Tyr Gln Val Gly Phe Leu Gln Ala Ala Pro Phe Arg Ser Ala Leu
20 25 30

Glu Asn Pro Pro Asp Ser Gly Val Arg Asn Glu Glu Glu Leu Arg Leu
35 40 45

Leu Leu Ala Ala Val Met Lys Asp Tyr Met Gln Met Lys Thr His Glu
50 55 60

Leu Glu Gln Glu Gln Glu Thr Glu Gly Ser Arg Val Ala Val Gln Lys
65 70 75 80

Arg Ser Cys Asn Ser Ala Thr Cys Val Ala His Trp Leu Gly Gly Leu
85 90 95

Leu Ser Arg Ala Gly Ser Val Ala Asn Thr Asn Leu Leu Pro Thr Ser
100 105 110

Met Gly Phe Lys Val Tyr Asn Arg Arg Arg Arg Glu Leu Lys Ala
115 120 125

<210> 12

<211> 37

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<221> modified amino acid

<222> (37)

<223> Leucine amide

<220>

<223> CRSP-2

<400> 12

Ser Cys Asn Thr Ala Ser Cys Val Thr His Lys Met Thr Gly Trp Leu

1

5

10

15

Ser Arg Ser Gly Ser Val Ala Lys Asn Asn Phe Met Pro Thr Asn Val

20

25

30

Asp Ser Lys Ile Leu

35

<210> 13

<211> 690

<212> DNA

<213> Swine

<220>

<223> CRSP-2 cDNA

<400> 13

ctcaagtgtc tctgccgctt ctccacagc gccatgcct gacgccaacg ctgctgcctc 60
 tgcicccicc tctgctccag tccacctggt tccigctgcc cgagggggcac catgggcctc 120
 tggaaatttc cgccttccct ggctctcagc atccctggcc tgtaccaggc aggcatgttc 180
 cacacagcac ccgtgagatt gcccttggag agcagccttg attctgccac tctcacagag 240
 gaggaaggtt cccctctact ggttgcaatg gigaaggatt atgtgcagat gaaggccact 300
 gctctggagc aggagtcaga ggacttcagc atcacigccc aggagaaatc ctgcaacact 360
 gctagctgtg tgaccacaa gatgacaggc tggctgagca gatctgggag cgtggctaag 420
 aacaacttca tgcaccacaa tgtggacttc aaaatcttgg gctgacgccg cagagagcct 480
 caggcctgag ctgtgaaatg atccacaaa gaaggtcacc aaggaactga actctatttc 540
 ttttaatctg caatgaaagc aatttatttg aaaaatagca tggaaaacac acatataatgc 600
 atgcttcttg ctgaaatac agcttttagc ttgaaataaa ctaaaactaa atgcagaata 660
 aaatcatlgt agctacctga aaaaaaaaaa 690

<210> 14

<211> 117

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<223> precursor peptide of CRSP-2

<400> 14

Met Gly Phe Trp Lys Phe Pro Pro Phe Leu Val Leu Ser Ile Leu Val

1

5

10

15

Leu Tyr Gln Ala Gly Met Phe His Thr Ala Pro Val Arg Leu Pro Leu

20

25

30

Glu Ser Ser Phe Asp Ser Ala Thr Leu Thr Glu Glu Glu Val Ser Leu

35

40

45

Leu Leu Val Ala Met Val Lys Asp Tyr Val Gln Met Lys Ala Thr Val

50

55

60

Leu Glu Gln Glu Ser Glu Asp Phe Ser Ile Thr Ala Gln Glu Lys Ser

65

70

75

80

Cys Asn Thr Ala Ser Cys Val Thr His Lys Met Thr Gly Trp Leu Ser

85

90

95

Arg Ser Gly Ser Val Ala Lys Asn Asn Phe Met Pro Thr Asn Val Asp

100

105

110

Ser Lys Ile Leu Gly

115

<210> 15

<211> 7673

<212> DNA

<213> Swine

<220>

<223> gene CRSP-2

<400> 15

ggaiccacta gtictagat aatggacaa ataccilagaa acagaagacc taccaagatg 60
gaaggatgaa gaaatagaaa aticaaatag acciatgact aggaaggaga atgaagcatt 120
aatccaaaaat cticcaaaca agaaaagccc tggatagat ggccicattg gtgaalagta 180
ccagacattt aaagaaaacg aataccaatc ctiglicaaac ttticccaaa accigaagag 240
aaaggacaca ccctaacctt ttctatgagg caggccaaca ttactctgat accaaagatg 300
gagaaagatt ctgcaaggag aaaaccctta cagacaaaat cctttatgac atggatgtgg 360
aaaccctcaa cagtatgcta gggaattgaa tticagaagcg tattaaaagg atcctacaac 420
atgaccaagt gggatgaatt tctggaatgc aaggatgatt caaaatatga aaatigatca 480
aagigtitata tcacaataat ggaatgtagg gaaaaacaca cctgattatt tccactgata 540
cagaaaatta tttagtaaaa ttcaatacct tticaggatt aaaaacaaaa actaggtata 600
gaaggagact gccicagcac aatacaacta tataigaaaa accaacacca acaccataat 660
ccagggtgga aaactgaaag cttttccctt aagatctgga agaaaatgga aaaaaatttt 720
taagaatttt cagacagatt tgggtctctg gtacacictg agaaatcatt ttttagaatt 780
tttttttttt aaaaataagc acaagaattt cattlaaaag aagggaata acatagcctt 840
cagagttaat caggagggtt aatttttttt tccacactag atgtggcta cctgatgcta 900
atlttgaggt ttaaacataa tgaaataaga ttgtacagcc aagtgccagc tagicatgga 960
acttttacct cagtactgtt tagtgcttca gtccaaagaa gtltcaggga gggctgcgtg 1020
caatacaagt aatcggtact tgcigaaggt ctaaaatttc gagtgcattt ggtaaatcag 1080
ggaatggcgc agaggagact ggttctgtta ctacagactag tgaacctag aatttagaaa 1140
gggtactttt gtgciccaaag caaatcctgt tctacctaac taggtccaaa tgcctgcag 1200
gctgtagita gagccctctc atagcaggga gactgccttg gtgaatctgc cagaggaaat 1260
gaatttccat tcacattcat tcaacaaca ttgggcgagt gccaccicat gtgcaaaaca 1320
tggtgctaag tgcataagaa aagatgtgtt ttgtlaaact taccgcagc tcagagccag 1380
gacttcttgg aaagtcagag gacttgagga aggagtcat ctacagccct ccttacttg 1440
agagactggc ttttctttcc aagtaaagct taaaactgct ggaggctaag tttagccctt 1500
ctgggggcag accctgattc ctgcccttca tccccagccc ttgtgtgtgt ggcgccaaag 1560
atttctgagt gaggaatgaa tgttggcttt gaacaggaaa ggcacaagt gcagccaagg 1620
gtagaatgct gagcctacaa attaacatag ttacaaattt gtcttctaaa ggagtcgttt 1680
cttagccata gtgcagccac ctltgcatgt atcaaaactg tggttcttcc aatgaaaaaa 1740

gacatcccca gacacacat tacaatg attcagaag attgatagg cggaatctc 1800
aggtttllgga ttttatttgc aaaagcggtt tgcgccigag ttttaaactt ttttttttt 1860
tttttttttt tglatttttt cacttctagg gcggttctgg cggcataatgg aaattccag 1920
gctaggggtc taataggcgc catagccacc ggcttaccgc agagctactg caacgctgga 1980
tccgagccgc atctgcaacc tacaccacaa ctacaggcaa tgcgggatcg ttaaccctact 2040
gagcaaggcc agggatcgaa cccgcaacct catgggtctt actcagattc gtttaaccct 2100
gcgccacgac ggccacacca acctaccaga ctcttaatta agtagcagag tccaatttac 2160
atgccgcacc acatctgta ccccgagta gcgaacttgg tcttggaaat aactctctac 2220
ggaaagccaa gccgagta ctataattata gtgttgaacc cccaaacctt ggtctggctt 2280
gtgcacccaa ttttggcttg tagtagaac caggatttac ggagcccgag cagtccgcca 2340
tcttgaactc tttctttct cacttggctt tcatcttga gtgcacctgc cctctatga 2400
ccagtttttc cgttcccttg gtttcccgat cgttgtctt tcttggagg agcgagatgc 2460
aagcaccga tttcttagcc ccaatatit attctcttgc gaaggagaaa agttagataa 2520
gggtatcttg taaatgagat gtcccgatc cagagagcac aaaccggcaa ggggaacaga 2580
tgtgccgca ggcaggttg cggaagata tagagaaggc tcaggttcgg acctgtggct 2640
caggtcacac tcatggcaga gtccggttta attcggctc tgcctggggg aaccacttaa 2700
ctggggctct tgcgtccctc caccggcccc cgtatgtgtt gcagcgtttg ccgcgttga 2760
gggtctgtac aggtctgtgc ggtttatgc tgtgtgtca gacacggta tctttagcag 2820
catccgaact ggattgggtt agatgtgggc acagggttgg aatcacaggt catgtgaaca 2880
tcttggcaaa cagcagccgg aagcaagggg cagctgggca aatggttctg ggacattgat 2940
gggttttagat gatgaatgtt ggggtctggag gtccgcttgg cggcttggga agcatctatg 3000
ccgtgcacgt ccttgcctaa gcccgatagg gcacatctt tcccatatg gtggaccgac 3060
caccagcgc gattccagac atccgcacag aggtggggat tgggcaaatg gatcgcatc 3120
gcacagaatc cctctgcac tttcttgga agctcttctc gatccctccc tgggtggaga 3180
gcaggtacat ggctactaat gataccctc cttaagacg ggaatatgat gcccgttcc 3240
aaaaattaat atatgaggt gctagaagac actagcccgat gatcttact acctagaaaa 3300
ggcacagctg gaacaaagt tccgtgtgac aaagactgt atcttgcctc ttgttccca 3360
caaattctgc ctctctgtc ttgattccag ctgcttgaat cagacccctt gcttgggcac 3420
agaatcatca acctgtctg catlaacct ccaaaccgca ctggacatg gtatcttag 3480

gggaccgggg atgcccttgta acgctggact ctgcctctaca aagatcacat agctggggat 3540
ggagagggat gtgagccctgc gaaaccgaac agglaaagtt taccatgacg tcaaactgtc 3600
cttaaattcc tgcctacatt gcgtgtgttt ttctgtgggtg cccaccaacc tccccacccc 3660
ctcccccccc cgccatcaat gacctcaatg caaalacaag tgggtgtgtc ctgttggatg 3720
ctccagggtc tggacgcaag tagtgacaca atccctggggc tcaggatctt tctctctatt 3780
ggttgccctgg agctctggga ccaccccaga ttccagagcgg cgggaataag agcagctgct 3840
ggtgcgggga aggggttagag gcactaccca ccicaagtgt ctctgccgt tcttccacag 3900
tgccatcgcc tgacgccaac gcctgtgctt ctgtccctc ctctgtctca gtccacctgg 3960
ttctgtctgc ccggtlaagcc cggagattcc tgcctaagctg tggttctgtt tctctctccc 4020
tctctctctt tctctctctc tccattggat ttctttagct gatctctttt cccgtctcaa 4080
agttcctgtc cacttctctc tgggtctctt catccgttaa tatgccctac tgcgcaattc 4140
attctaggct cctttcacag glaactctgg atgggtctcag ttccggggatt cctgtctcta 4200
ctcttctcta gctgagctgg gctccagctt tgtcccccga gcagacgtgc ttaggtccgt 4260
gttgggattt tggagctctc caggcacctc agggagagga ggaatgcagga atagcttcta 4320
gcagaagaaa ctttcatgga tcccatctcc tcttacctac aaggatcgct ggaaatgggg 4380
tcgggacctg ggacagtga aatgggtggc aaatagggtc aatgactgag gggaaagtag 4440
ctattaaacg caagccccag tgaagggtc tgggaactcc cctccccga ccgccacccc 4500
atttaattct gggtcccaat ttaaggctgt accggctgtt ttcttacagg gtgtctcttg 4560
ccagagtatg gacgagctgg acagtataat ttgggtcttc agtttctcag ggattccaac 4620
tgcagagata tgtctctcca acctcccttc cccccagcca ggtataagca aaaatcaggc 4680
atcaggagag atgctgatgg gtgtcactat gggaaaagct gtgtgtgacag gtactgtgag 4740
tctgtctctc aggagtcctg gccaacaggt tgaaggtag agtgtgggtg tgcctggcag 4800
ggggtatgg acggagacct tctcaccag ttgtctgtct aggttcttt gctaaaccaa 4860
gcatgttgca ggctcactgg atcttccagc agtccacttg gctgaggagg aaatgatgtt 4920
gaaaggaaag gacacgagca gcctgaagcc aggaagccag ggagtggag gcagaggcag 4980
gagcagagcc caggctgtgt ggctcaatga acttgggaact gctacagggt gtgacattgt 5040
tcttcccttg cagaggggca ccatgggctt ctggaaattt ccgcccctcc tgggtctcag 5100
catccctggc ctgtaccagg caggcatgtt ccacacagca cccgtgaggt aagacagcac 5160
tggltggcagt gctctcgctt cccacggccc ccggaatcat atagttctgt attgtgagtt 5220

gtgctgtggt gagtctggc ttgggtgggc ttctgtgtat aggggggtgt gggctccta 5280
glatgaatat agtcatgtat ataagtttat tataaatatt ttgtgatcca agataatata 5340
acaaagtita caaataaata gaagatatatac agtattcact ataaattct aaactcactg 5400
aaccttacag catgtttttg ttgcttttta tgaaatgttt ataactttag caaacctata 5460
tagtaattta gccataattt gagcaatgaa ttgcaattcta attagtaat ttgtcaataa 5520
atttgttatt aaatctgaaa ggtaattctat acaatttctc accctcttfc aaattatatt 5580
aataigaaac cattttcata ttcaaaciat catttaattt ttaataatgg ctgtatttaa 5640
cactaagctc atacaattcc tgaagaicta accatcagct ttcaaaagcc tacaigatgc 5700
actttcagca gaactacttt gtggacaccc cagagcctaa ctcatggiga agcagcattt 5760
ttggatgaac actagcctta tgtcttgacc gttgagaatt tcatcagcct tattctcaga 5820
ggaagltgca gaaaccagga aatctggctg ctatccttag ggctgtggta ggctcagagc 5880
gcatgttggg ctgtcttcc ctctccagat tgcctttgga gagcagcttt gattctgcca 5940
ctctcacaga ggaggaagtg tccctcttac tggttgcaat ggigaaggat taigtgcaga 6000
tgaaggccac tgtgtcggag caggagtcag aggacttcag gtcagtcctt gcacccctcc 6060
cagaatatgg ctacccctc ccttagagta ccaggaaggc atalccttaa gaatgagatt 6120
tgttatagtg ccataagcct tgatgtccag tctcataage ctgtgtttat ttttagttta 6180
ttacacagga gagatgtct attacagttc tgatttcag gtccagtaat gcagagccac 6240
ctttgggttt tctgacaccc ctgaaaatgt ctatggggag tgaatgca ttttcccaaa 6300
agccctatgg ttttctgtt ggattttgt ttttagcagaa acatttcagg ttacatggctc 6360
cctctcagag ctgtaatttt ccactgatgg tcagtcctgg ggggaatcac ttgccctcaa 6420
gctgtcatig gcaggccttc tcttgtctc calcctgaaa atcagcatca ctgcccagga 6480
gaaatcctgc aacactgcta gctgtgtgac ccacaagaig acaggctggc tgagcagatc 6540
tgggagcgtg gctaagaaca acttcatgcc caccaatgtg gactccaaa tcttgggctg 6600
acgccgcaga gagcctcagg cctgagctgt gaaatgactc cacaagaag gtgactgtctc 6660
tagaacatgg gatagcaggg caaatggctg ggtaattcag ggggtgtggc tacactctaa 6720
ccctccctga gccgttactg taaaaaaaaa tccataatga agttgtgtac cccattatcc 6780
tcagaaagaa aagagaatcc taatagccaa aacccctata acttaggttc atttctattt 6840
tttccagtg tctccagtg actctgaggt catctgtcag gaaacataga ttctattctt 6900
tttcttttc tttttggcta cacccaaggc atgtgaaagt ttttgggcca gggatigaat 6960

ctgaaccata gctgtgacc atgcagtacc tgtggcaaca ctggatccit aacccaatgt 7020
 accacatcag gaactccctag gicctattat ttaaaacact gticccctgca gttataattg 7080
 tgattatctt agtttttgag ttgaaaggt aatgaatcta tccagttagt ttgaagtata 7140
 actacaatgt cacatataat tgaattcaga gcatigacit ggtticaaat gcgatgtctg 7200
 tcttccacta actatacaac catgggccag accctctctg aacctcagtt ctacatgaaa 7260
 ctttaaggca acaataatat ttaccigtta tcatthaalat aaaaagtaac tgagataatt 7320
 catggtaaga gccctactat taataagtaa taatattcta gctcttattt tttttctcc 7380
 taggtcacca aggaactgaa cctatattct tttaatctgc aatgaaagca atttatttga 7440
 aaaatagcat ggaaaacaca catataatgca tgcctcttgc ttgaaataca gccttttagct 7500
 tgaaataaac taaaactaaa tgcagaataa aatcaatgca gctaccgat atgtatcatt 7560
 ttaatatitg attctgtatt ctataagta gacatcgtc tgcctggctt atctggttagc 7620
 aaatctggac ccgttcagcc aacctgttgg tggtagcagc tctgctaaac ctc 7673

<210> 16

<211> 37

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<221> modified amino acid

<222> (37)

<223> Leucine amide

<220>

<223> CRSP-3

<400> 16

Ser Cys Asn Thr Ala Ile Cys Val Thr His Lys Met Ala Gly Trp Leu

1

5

10

15

Ser Arg Ser Gly Ser Val Val Lys Asn Asn Phe Met Pro Ile Asn Met

20

25

30

Gly Ser Lys Val Leu

35

<210> 17

<211> 685

<212> DNA

<213> Swine

<220>

<223> CRSP-3 cDNA

<400> 17

gcccagctta cgctccttt ctcgccagt gccatcacct gccaccagcg cggttgttgc 60
ttctccact tgggtccaa gctacctgtt tctgtcatcc agaggggcac catgggcttc 120
tggaagtcc ccccttctt galctcagc atcttggtcc tglaccaagc aggaatgctc 180
catgccgcgc catcaggat ggctttggga agcagcttgc attctgccac actcacggaa 240
gaggaaatgt cctcctact ggttgcaatg gtgaaggatt atgtgcagat gaaggccact 300
gtgctggagc aggagacaga ggacttcagc atcaccaccc aggagagatc ctgcaacact 360
gccatctgtg tgaccacaa gatggcaggc tggctgagca galctgggag cgtggttaag 420
aacaacttca tgcccatcaa catgggctcc aaagtcttgg gccggcgccg cagacagcct 480
caggcctgag ctgtgaaaig actctaaaaa gaagttgaac tcaagttgtt ttacttgcaa 540
agttgctttc cctgcaaat aaaagaacca atttgaaaaa tagcatggaa gacacacata 600
tatgcatgtt tcttgcttga aatacaactt ttgtcttgaa acaaactaaa cctaaatgca 660

gaataaaaatc attgcagttt cctga

685

<210> 18

<211> 125

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<223> precursor peptide of CRSP-3

<400> 18

Met Gly Phe Trp Lys Phe Pro Pro Phe Leu Ile Leu Ser Ile Leu Val

1

5

10

15

Leu Tyr Gln Ala Gly Met Leu His Ala Ala Pro Phe Arg Met Ala Leu

20

25

30

Gly Ser Ser Phe Asp Ser Ala Thr Leu Thr Glu Glu Glu Met Ser Leu

35

40

45

Leu Leu Val Ala Met Val Lys Asp Tyr Val Gln Met Lys Ala Thr Val

50

55

60

Leu Glu Gln Glu Thr Glu Asp Phe Ser Ile Thr Thr Gln Glu Arg Ser

65

70

75

80

Cys Asn Thr Ala Ile Cys Val Thr His Lys Met Ala Gly Trp Leu Ser

85

90

95

Arg Ser Gly Ser Val Val Lys Asn Asn Phe Met Pro Ile Asn Met Gly
100 105 110

Ser Lys Val Leu Gly Arg Arg Arg Arg Gln Pro Gln Ala
115 120 125

<210> 19

<211> 33

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<221> modified amino acid

<222> (33)

<223> Serine amide

<220>

<221> modified amino acid

<222> (1)

<223> pyroglutamic acid

<220>

<223> CT-2

<400> 19

Glu Cys Asn Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Thr Tyr Thr Trp Asp
1 5 10 15

Val Asn Lys Phe Tyr Ala Phe Pro Leu Thr Thr Thr Gly Ile Arg Val

20

25

30

Ser

<210> 20

<211> 802

<212> DNA

<213> Swine

<220>

<223> CT-2 cDNA

<400> 20

gcccagctta cgtctccitt ctcgcccagl gccatcacct gccaccagcg cggttgltgc 60
ttctcccact tgggtccaa gctacctggt tcttgcattcc agagggggcac catgggcctc 120
tggaagticc ccccttccct gatcttcagc atcttgggtcc tglaccaagc aggaatgctc 180
catgccgcgc catcaggat ggcttggga agcagctttg attctgccac actcacggaa 240
gaggaaaigt ccttcttact ggttgcaatg gtgaaggatt atgtgcagat gaaggccact 300
gtgcaggagc aggagacaga ggacttcagc ctggacagct ccagagctaa gcagtgcatt 360
aatctgaglia cctgtgtgct gggaacatat acatgggacg tcaacaagtt ttatgcattc 420
cccttaacta caactgggat tagagtatct ggcaagaaat gggtcagggc cagagcttca 480
gagaaagtcc attatccctc aaggcagcat accctaaggt gcttaagaag gccccaccc 540
ctcttccitt ctagtcttc tcttagaatt tgcattggtt ctctcttggt tgcctctga 600
gctgctatca gcagcttcc ttgtggccat ggaatgctgg aatatcagag aggaggtggg 660
gggtgggggc aggcaggcca gaagaaaatc actcaggaat agattaggag agaattgggca 720

gcccigtgag tgcclgtggc ttcacagca gagcttctca gtccigtctt gaacatgct 780
 tticactagg gaataaaagt at 802

<210> 21

<211> 162

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<223> precursor peptide of CT-2

<400> 21

Met Gly Phe Trp Lys Phe Pro Pro Phe Leu Ile Leu Ser Ile Leu Val
 1 5 10 15

Leu Tyr Gln Ala Gly Met Leu His Ala Ala Pro Phe Arg Met Ala Leu
 20 25 30

Gly Ser Ser Phe Asp Ser Ala Thr Leu Thr Glu Glu Glu Met Ser Leu
 35 40 45

Leu Leu Val Ala Met Val Lys Asp Tyr Val Gln Met Lys Ala Thr Val
 50 55 60

Leu Glu Gln Glu Thr Glu Asp Phe Ser Leu Asp Ser Ser Arg Ala Lys
 65 70 75 80

Gln Cys Asn Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Thr Tyr Thr Trp Asp

85

90

95

Val Asn Lys Phe Tyr Ala Phe Pro Leu Thr Thr Thr Gly Ile Arg Val
100 105 110

Ser Gly Lys Lys Trp Val Arg Ala Arg Val Ser Glu Lys Val His Tyr
115 120 125

Pro Ser Arg Gln His Thr Leu Arg Cys Leu Arg Arg Pro Pro Pro Leu
130 135 140

Leu Leu Ser Ser Ser Ser Pro Arg Ile Cys Met Cys Ser Ser Leu Val
145 150 155 160

Ala Leu

<210> 22

<211> 7142

<212> DNA

<213> Swine

<220>

<223> gene of CRSP-3 and CT-2

<400> 22

taccggggccc cccctcgagg tgcacgggat cgataagctt gataatcgaat tccatgcagcc 60
cggggggatcc ttaaccaact gagggaggcc agggattgaa ctgcgcccic atggatacta 120

gtccggtttg ttacacctt gcaacgggaa cccccctggc cacttgaag aggggtttca 180
tacagatcct cccacciccg ctatcagiga cctcaatgcg aatacaagt cgggtggttct 240
gttaaattct ccagggtccg gaagcaagta ccgacataat cctcttgggg ctgaggattt 300
ttccctcat tgggtgccig gagtccagg accaccctgg attcacagca gcgggaataa 360
gagcagcigc tgggtgcigag aggcattaga agcacigccc agctaacgic tctttctcc 420
gccagtgcc aaccigcca ccagcgcggt tgggtctct cccacttggg ctccaagcta 480
cctggttctt gcatccaggt aagtccaaag attctgcta gctgtgattc tatttctct 540
ctccctctcc tccctccat ttctctcca ttactttcc ttgccggctc cagaggctct 600
atccatttcc ctgggagttc ctctatcact caatctatta cgcgatttat ctgggggtcc 660
tttaacaggt aacactaaac ggtctcagtt ccagacactg agcttggctc cagttttgcg 720
gtctcttgc gcatagtgc ttaggtaat ctgaggaagc tggagcttcc tcaagcaatg 780
cgggctgagc agaacgcaga ataactttgt gtagaccgtg agctcaggga aacctcttg 840
tgcctagcig ctgcccggaa atagactcat ttgggaatgg attcggaact tagaccagg 900
gaagcgggtg gcaaatagat gcaagacig aggggcagg agccattcaa ctgcaagtc 960
tagctgccag ttgggggagt ttttgggtg ttttttctc cccagtttaa gtccgtgtc 1020
ctaattlaag attccaccag ctgtttttt acagggtact ctttgccaaa gttgaagca 1080
gctgagcagt agaatttgg tcttcagttt ctgagtatt ctaccacag agatagttc 1140
tcccaatccc cctccctgc cagctatgag caaaagcctg gtccctggaa gacaactctg 1200
ggttgcatta tgtgaaaagc tgggtggct tactccgagt ttgtctcca ggagcttgg 1260
ccaagaggtt gcaggigaga gagtgttgg tactggggag ggggcaatgg actgagacca 1320
cctcaccag atgtcttgg aggttcttt gctaaacca gcatgctgca agcgcacig 1380
atatctcagc agtgcactig gctgaggaga aaatgatgt gaactgaaat gataagacca 1440
gctgaagcc aagaaccag ggagttagag gcagaggcag gagcagaatc cagggtctgt 1500
aggctcatag aacttggaa tcttacaggt ggtagacta ttcttccct gcagaggggc 1560
accatgggt ctggaagt cccccctc ctgacttca gcatcttgg cctgtacca 1620
gcaggaalg tccatgccg gccattcagg taagccagcc ctgccaggag cctctcacc 1680
tccctcaacc ctgaaatct tagagtctg tgtgagtg tactatgctg aataaggctc 1740
tctgtgggt tgtgggggtg tgggtcctg atgtacgaat gtaaactgt atacaagta 1800
atcagaaatg tttaggagg ctatgtatc caagtttac aaataaaca aataatagt 1860

acitgttatt tcatataacg cactgaacct cacagcatgc tgcattgct tttctcaaa 1920
catttgtacc tttagcaaac ctatttacta atttaccat actttgagca gtgggttaca 1980
tcctaattcg ctaattactt taccaataaa ttgtttatta aatgtgatat gtgggtcata 2040
calctaattt ctaccctca ttcaaattat attagataa atattttcat attcaaaacta 2100
tcattatcat ttattgttta ataattggcgt tatllaacac taagctcata cagtccctga 2160
aaattaccat cagctttcaa aagcctatat galccaccct cagcaaacct ctcttttag 2220
gtcaccctag agcctaactc gtgggtgaagc agcatttttg calgaatact ggccctcatgt 2280
ccgtctgtgt gagtttggtt ggccacatcc tcagtggagc tggcagaaat gaggagttagg 2340
ggttggggta ggctcagcac atgttgggtt tgcctccctt cccaggaag gctttgggaa 2400
gcagctttga ttctgccaca ctacaggaag aggaaatgtc cctcctactg gttagaatgg 2460
tgaaggatta tgtgcagatg aaggccactg tgcctggagca ggagacagag gacttcaggt 2520
cagctctgc accctccca gaataaggct taccctctcc cctggagtag caggaaggca 2580
tgcgctgtg catgcacatg cacactcaca cacacaggta ggagagagca cagctagaca 2640
ggcagcctgg ggcacaactc ttctacaggc tccactaaaa tcataggta tgtggaagaa 2700
ccacagataa aaacattctt ttctgaaagc agtaggggaa gccgtgagat cacttacagt 2760
ggaaattttg tagcagtact tgggagacct cccagcacgt gagtttagcc ttgtaaggta 2820
aagccaggga atgaatcica tglactcag gagattttag aaatttggct cctctctgtt 2880
aaccigccca tgaattctt tccacacctg aaggcatctt cattgcacat ttgcaagggt 2940
aagccagagc acttagaaaa gatgagtcag gtagagcagt ttctgaaata ggctcagaggc 3000
cttttagatgt gtagaatctg tggagatgtg catgttctca tggggccaga cactttctc 3060
cagtcaccaac tctctgtgca ctgagtttac tgttcatacc agctcctgac cgagctgtac 3120
ctgggcagag gcatgtgtg cactttatc cgccttaaga accctgtgtc agagcataaa 3180
ggctcagagca gcatgtggaa tgccagaaaa ggctgtccct cccaccaca gcccttcccc 3240
acatcgccct ggctcagtag accctgtcat cctcctaagt gaggaatcat gagccgccc 3300
cctgtgtgcc cctcctgtcc tctgttcag gtccccctc cctggcttaa cctctgcat 3360
gactgccctt gggggcagcc ctgggtcatg gtagtctgt gcatgtctt tccctgcagc 3420
ctggacagct ccagagctaa gcagtgcaat aatctgagta cctgtgtgt gggaacatat 3480
acatgggacg tcaacaagtt ttatgattc ccttaacta caactgggat tagagtatct 3540
ggcaagaaat gggtcagggc cagagctca gagaaagtc attatccctc aaggcagcat 3600

accctaaggt gcttaagaag gccccaccc ctccctcttt ctagttccle tccctagaatt 3660
tgcattgtgt cttctctgtt tgcctcttga gctgctatca gcagcttcc ttgtggccat 3720
ggaigtctgg aatctcagag aggaggctgg ggggtggggc aggcaggcca gaagaaaatc 3780
actcaggaat agattaggag agaattggca gccctgtgag tgcctgtgga ttccacagca 3840
gagcttctca gtccgtcttc tgaacatgct ttccactagg gaataaaagt atgtttctaa 3900
aaacacctga gctatagtgg ccatgtcaca tgcctcatgg atacagagac ttgtctgtca 3960
agtagcccta gtccgtggga gctggagctc gggcatgggt gggtgtccct ggagcaacct 4020
caagtigcaa aatcaggagc actaaggaa aaaacaagca cctctgggac ttgatgtctac 4080
aaactcactt cctcttgag gaagacagg gaactttct tttctaaagg agtactcagt 4140
accctgaat gggaggcacc ttccagacaa gtccctaaga atggggttgg gtgtgccacc 4200
aaaatctctc taigtcttgg ttaaatttta gtttacttgt acagaaaaga ttggctgtta 4260
aagtctgtg ttccctgggt tgttggccag agcacatttg ggtttctga cacccttgga 4320
aatgtctatg gagagtatg atggcatttc cccaaaagcc ctaiggttt ctgttgggat 4380
tttgtgttta gcagaaacat ttccagttca ctggctccc ctccagagct attttccac 4440
ggatggctag tccgtggggg aagcaccctgc cctcaggctc tccctgacag gccttctctt 4500
tgtctccatc ctgaaaatca gcatcaccac ccaggagaga tccctgcaaca ctgccatctg 4560
tgtgaccac aagaatggcag gctggctgag cagatctggg agcgtggta agaacaactt 4620
catgcccac aacatgggt ccaaagctt gggccggcgc cgcagacagc ctccaggcctg 4680
agctgtgaaa tgactctaaa aagaaggta ctgctctaga acctggggta gcagggcaaa 4740
tggctgggta ttgcagaggt gctggccaca ctctaacctt ccgtgggcct gtattataaa 4800
aacatccaca gcaaaagggc caaccctagt gtccagagaa agaacagggt cccaagagct 4860
gaaatcccta gaatttggaa tccctctat tttttcagt ttctccagt gattctgaga 4920
tcatctgcaa ggaaatatag atcctatgaa tttaaaacac tgttccctgc acttacaatt 4980
gccattgtag gttttgagtt ttaaaggtaa tgaacctatc caatgagttt gaagtatatc 5040
gtacaatgtc acgtacacct gaattcagag catagacttg gtttcaaag tgaatgtgt 5100
cctctactaa ctataagac atggggccagg cctctctgc gtctcagct ctacatgtaa 5160
ttttaaggca aaaacagtat ctaccgtta ttgttaatat aaaaagtaat tgagataatt 5220
catggcaaga gccctaacat taataaataa taatacccta gctctgttt ttttttctc 5280
ctaggctacc aagaagtga actcaagtgt cttcactgc aaagtgtct tccctgcaaa 5340

ttaaaagaac caatttgaaa aatagcaagg aagacacaca tataatgcatg ctctcttgctt 5400
gaaatacaac tttttgcttg aaacaaacta aacctaaaig cagaataaaa tcaatgcagt 5460
taccigatgt gtaatctttt aatatttgat tctgtattct gtaagtaaga ctcatgtctc 5520
actggcttat cggtagcaa atciggacce tgcagccaa ccgtttggig gtggcagctc 5580
tgctaaacct caggagcaca tgaatttgc gccctatggg tgcctgggga tgcacagaaa 5640
tgttgagcct cagtggaaacc tttaaagaaa tggctttgga attcccatca tagctcagtg 5700
gaagcaaatic tgaccagcat cgataaggat gccggtttga tccatggcct tgcctatgg 5760
gtcaaggata tgttttgcc atgagctgtg gtaataggta caggcgcagc tcagatctgg 5820
catgtctgtg gctgttggtat aggccagcag ctgcagctcc gatcaaccg ctagcctggg 5880
aacctccatg tgcctcaggt gcggccctaa aaagacagaa aaaaagaaga gaaaaaaaaa 5940
tgttctcat ttttacttc atcaagccag aaaatgtatt ttacgtacac ttaaaaggag 6000
tccctgtgc tatttatgtc gtttcccca taagaacctc aggaccgtg gaacacttgg 6060
ttgaccaggt tgcctaaatg aggcaatctc gtgcttgggg tgggtctca gtaacctgta 6120
ctctcaggt ctatgtgaaac atccctatgg gattagaatc ctctgcatct cagagagaca 6180
ttcacattct cagagggcac cctgttccc agccccagaa gttatctgtt ctctctctcc 6240
ttgactcagg ttgtccctta tccatccctg ctttctctc ccaacagctc ctctttacac 6300
atccctatgc ctgcaaaacc cttagagca atggctcaca gcttgaaagg gtaatgcaga 6360
ctggcagacc tggaaaggct ctcatatgcc atctaattca actttttact ctgaagtgtg 6420
cagagaagga aaattatgtt gctcagggct ctgcaataac ttatgtgagac atccctatat 6480
ttaagaaata ataattgagt gctctgtatc tctttgacac tatttaagct ccaggaatag 6540
agcaataaac agaacagaca aaacccccctg catcatgga gcttatattc taactggaag 6600
agactgaggt gatacatgtc ctggaattag aaacattcag cactggaagg aatctgggat 6660
gtcataaggg tataaaggct tatttgatat agctatttca tgggatcaac atccctggca 6720
tatgtctgga atgtctgtta ccatctgttg actatgactt ccaaggigac tggacagcca 6780
gtttcatlgt tggacagica attaagtggg atattttcca tttagagaagt catccctac 6840
tacctacaga ttatagttat ttcttaagaa gcacatagaa ttaigacctt tctccattc 6900
attctgtagt catcacagta acccaacctt agccataaag gtagatcaga ccatgtctcc 6960
cttaggacag aatattctat tatagactcc cttcttcaca aagtaaacat tttaggcatt 7020
gcagtgctt cttaatcaac tctacttggg cagagtatat gtattaaaat ttacttccaa 7080

atttggaatt ccciggtggcgaaggatcca ctagtictag agcggccgcc accgcggigg 7140

ag

7142

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/06641

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C07K14/47, A61K38/00, A61P3/04, 7/10, 9/10, 9/12, 19/10, 25/04, 35/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C07K14/47, A61K38/00, A61P3/04, 7/10, 9/10, 9/12, 19/10, 25/04, 35/00, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00/69900 A2 (CONJUCHEM INC.), 23 November, 2000 (23.11.00), & EP 1105409 A2 & JP 2003-508350 A	1-9
P, X	KATAFUCHI, T. et al., Calcitonin receptor-stimulating peptide, a new member of the calcitonin gene-related peptide family. Its isolation from porcine brain, structure, tissue distribution, and biological activity. J.Biol.Chem., 2003, Vol.278, No.14, p.12046-54	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
30 July, 2003 (30.07.03)

Date of mailing of the international search report
12 August, 2003 (12.08.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09, C07K14/47, A61K38/00,
A61P3/04, 7/10, 9/10, 9/12, 19/10, 25/04, 35/00, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09, C07K14/47, A61K38/00,
A61P3/04, 7/10, 9/10, 9/12, 19/10, 25/04, 35/00, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 00/69900 A2(CONJUCHEM INC)2000.11.23 & EP 1105409 A2 & JP 2003-508350 A	1-9
PX	Katafuchi T. et al, Calcitonin receptor-stimulating peptide, a new member of the calcitonin gene-related peptide family. Its isolation from porcine brain, structure, tissue distribu- -tion, and biological activity. J Biol Chem. 2003, Vol. 278, No. 14, p. 12046-54	1-9

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30.07.03

国際調査報告の発送日

12.08.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子



4N

9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.